

Einsatz einer In-situ-Hybridisierung zum Nachweis von  
*Mycoplasma hyopneumoniae*-DNA in Lungen aus der  
Schlachttierkörperuntersuchung von Schweinen

von Niklas Michail Peters-Lindner





Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Einsatz einer In-situ-Hybridisierung zum Nachweis von  
*Mycoplasma hyopneumoniae*-DNA in Lungen aus der  
Schlachttierkörperuntersuchung von Schweinen

von Niklas Michail Peters-Lindner

aus Marbach am Neckar

München 2021



Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Krankheiten des Schweines

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Mitbetreuung durch: PD Dr. habil. Matthias Eddicks



**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

**Dekan:** Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

**Berichterstatter:** Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

**Korreferent:** Priv.-Doz. Dr. Bianca Schulz

**Tag der Promotion: 17. Juli 2021**





Meinen Eltern, insbesondere meinem Vater und tiermedizinischen Vorbild

Dr. med. vet. Friedrich Lindner



## INHALTSVERZEICHNIS

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>	<b>3</b>
<b>1.</b>	<b>Ätiologie.....</b>	<b>3</b>
1.1.	Taxonomie .....	3
1.2.	Morphologie .....	3
1.3.	Epidemiologie .....	4
1.4.	Pathogenese .....	6
1.5.	Klinischer Verlauf .....	8
<b>2.</b>	<b>Diagnostik .....</b>	<b>9</b>
2.1.	Klinik.....	10
2.2.	Scoring von Lungenläsionen am Schlachthof.....	10
2.3.	Direkter Erregernachweis.....	12
2.3.1.	Erregeranzucht .....	12
2.3.2.	Polymerase-Kettenreaktion.....	12
2.4.	Serologie.....	14
2.5.	Intraläsionaler Errgernachweis.....	16
2.5.1.	In-situ-Hybridisierung (ISH) und Fluoreszenz-in-situ- Hybridisierung (FISH) .....	16
2.5.2.	Lokalisation von <i>M. hyopneumoniae</i> im Gewebe .....	18
2.5.3.	Immunhistochemie (IHC) und Immunfluoreszenz-Assay (IFA) .....	19
2.6.	Makroskopische und pathohistologische Untersuchungsbefunde	19
2.6.1.	Makroskopische Läsionen .....	19
2.6.2.	Mikroskopische Läsionen .....	20
2.6.3.	BALT-Anbildung und Klassifizierung .....	23
<b>3.</b>	<b>Bekämpfung, Prophylaxe und Eradikation .....</b>	<b>25</b>
<b>III.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>29</b>
<b>1.</b>	<b>Untersuchungsmaterial.....</b>	<b>29</b>
<b>2.</b>	<b>Methoden I.....</b>	<b>29</b>
2.1.	Scoring der Lungenläsionen am Schlachthof .....	30
2.2.	Entnahme Gewebeproben .....	30
2.3.	Durchführung der qPCR .....	30

<b>3.</b>	<b>Methoden II.....</b>	<b>31</b>
3.1.	Schneiden der Paraffinblöcke .....	31
3.2.	Protokoll zur Durchführung der Hämalaun-Eosin (HE) Färbung ..	31
3.3.	Protokoll zur Durchführung der In-situ-Hybridisierung .....	32
3.4.	Beurteilung der histologischen Schnitte.....	34
3.4.1.	Scoring der HE-Proben.....	34
3.4.2.	Scoring der ISH-Proben.....	36
<b>4.</b>	<b>Statistik .....</b>	<b>36</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>39</b>
<b>1.</b>	<b>Beurteilung von Lungenläsionen am Schlachthof.....</b>	<b>39</b>
1.1.	Verteilung der Läsionen innerhalb der Lungen.....	40
1.2.	Verteilung der Schweregrade innerhalb der Lungen .....	41
<b>2.</b>	<b>Histologisches Scoring.....</b>	<b>42</b>
2.1.	Scoring der Hämalaun-Eosin gefärbten Schnitte .....	42
2.1.1.	Verdickung der Alveolarsepten.....	43
2.1.2.	Ausprägung der Hyperplasie des Bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebes .....	44
2.1.3.	Exsudat in den Alveolen .....	45
2.1.4.	Peribronchiale und peribronchioläre Infiltration mit Entzündungszellen.....	46
2.2.	Scoring der In-situ-Hybridisierung.....	47
2.3.	Verteilung der Grade der ISH auf die Lokalisationen .....	50
<b>3.</b>	<b>Statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse.....</b>	<b>51</b>
3.1.	Korrelationen zwischen den quantitativen molekularbiologischen Ergebnissen (qPCR) und den Befunden der ISH .....	51
3.2.	Korrelationen zwischen den Ergebnissen der makroskopischen Untersuchung und der Erregerlast in den Lungengewebeproben (qPCR) sowie den Befunden der ISH .....	53
3.3.	Korrelationen zwischen den Ergebnissen des mikroskopischen HE- Scorings und der Erregerlast in den Lungengewebeproben (qPCR) sowie den Befunden der ISH .....	53
3.4.	Untersuchung auf gruppenbasierte Unterschiede.....	53

---

4.	Berechnung der Sensitivität und des positiven Vorhersagewertes der durchgeführten In-situ-Hybridisierung	54
V.	DISKUSSION .....	57
1.	Nachweis von <i>M. hyopneumoniae</i> -DNA mittels ISH.....	57
2.	Korrelationen der ISH mit den in der qPCR ermittelten Erregerlasten .....	60
3.	Relevanz einer ISH zum Nachweis von klinischen Infektionen durch <i>M. hyopneumoniae</i> .....	62
VI.	ZUSAMMENFASSUNG .....	67
VII.	SUMMARY .....	69
VIII.	TABELLENVERZEICHNIS .....	71
IX.	ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	73
X.	LITERATURVERZEICHNIS .....	75
XI.	ANHANG.....	97
1.	Befunddokumentation.....	97
2.	Geräte.....	101
3.	Verwendete Gebrauchslösungen .....	101
XII.	DANKSAGUNG.....	107



**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AK	Antikörper
Aqua dest.	destilliertes Wasser
BALT	bronchus-associated lymphoid tissue
BALF	bronchioalveoläre Lavageflüssigkeit
bp	Basenpaare
CT	cycle threshold
CVPC	cranioventral pulmonary consolidation
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EP	Enzootische Pneumonie
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
g	Gramm
HE	Hämalaun-Eosin
IFA	Immunfluoreszenz-Assay
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
IL10	Interleukin 10
kBp	Kilobasenpaar
kg	Kilogramm
LT	Larynx tupfer
M.	Mycoplasma
max.	Maximum
MCC	mucociliar clearance
min.	Minimum
MIRD	mykoplasma induced respiratory disease
ml	Milliliter
NaCl	Natriumchlorid
nPCR	nested-polymerase chain reaction
NT	Nasentupfer
OF	oral fluid



---

PCR	polymerase chain reaction
PCV2	porzines Circovirus Typ 2
p.i.	post infektionem
p.m.	post mortem
PMN	polymorphonuclear leucocyte (neutrophiler Granulozyt)
PMWS	postweaning multisystemic wasting syndrome
PPLO	pleuropneumonia-like organisms
PPV	positive predictive value
PRDC	porcine respiratory disease complex
PRRSV	porzines reproduktives und respiratorisches Syndrom Virus
qPCR	quantitative PCR
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rRNA	ribosomal ribonucleic acid (ribosomale Ribonukleinsäure)
SIV	Schweineinfluenzavirus
SPF	spezifisch pathogenfrei
spp.	Spezies
TBS	tracheobronchial swab (Tracheobronchialtupfer)
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor-alpha
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer

## I. EINLEITUNG

*Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* ist das ätiologische Agens der Enzootischen Pneumonie (EP) und einer der relevantesten Erreger, die bei der Entstehung des porcine respiratory disease complex (PRDC) mitwirken (PIETERS & MAES, 2019). Das Bakterium gelangt über die Atmung in die luftführenden Wege und besiedelt dort das zilientragende respiratorische Epithel (BLANCHARD et al., 1992). Gemeinsam mit modulatorischen Effekten auf das Immunsystem (CARUSO & ROSS, 1990; RODRÍGUEZ et al., 2016) und einer Störung der mukoziliären Clearance (JACQUES et al., 1992), wird das Eindringen und die Proliferation von Sekundärerregern in der Lunge erleichtert. Infektionen durch *M. hyopneumoniae* kommen in Schweinebeständen weltweit vor und sind durch chronische Verläufe, meist einhergehend mit hoher Morbidität bei geringer Mortalität, gekennzeichnet (PIETERS & MAES, 2019). Die Bestimmung des ursächlichen Erregers innerhalb eines Krankheitskomplexes wie der EP ist von großer Bedeutsamkeit, da dies die Grundvoraussetzung aller folgenden therapeutischen und prophylaktischen Maßnahmen im Zuge der Bestandsbetreuung darstellt (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Der Nachweis einer Infektion mit *M. hyopneumoniae* beruht meist auf klinischen Anzeichen, der post-mortem Identifikation makroskopischer und mikroskopischer *M. hyopneumoniae*-typischer Läsionen und dem direkten Erregernachweis mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (SIBILA et al., 2009). Verschiedene Verfahren zum intraläsionalen Erregernachweis wurden etabliert, kommen jedoch bisher mehr in der Forschung als bei der Routinediagnostik zum Einsatz (PIETERS & MAES, 2019).

Ziel dieser Untersuchung war es *M. hyopneumoniae*-DNA in Lungengewebeproben von Schweinen, welche im Zuge der Schlachttierkörperuntersuchung gewonnen wurden, intraläsional nachzuweisen. Hierfür wurde eine am Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München neu etablierte In-situ-Hybridisierung (ISH) verwendet. Die im Zuge der Auswertung der ISH gemachten Beobachtungen sollten anschließend, insbesondere im

Hinblick auf die Qualität ihrer diagnostischen Aussagekraft, auf einen Zusammenhang mit weiteren Nachweisverfahren hin untersucht werden. Dadurch sollte herausgearbeitet werden, inwieweit eine ISH bei einer Infektion mit *M. hyopneumoniae* für die Diagnostik verwendet werden kann.

## II. LITERATURÜBERSICHT

### 1. Ätiologie

#### 1.1. Taxonomie

Im Jahre 1898 wurden Mykoplasmen erstmalig als Auslöser der Lungenseuche beim Rind beschrieben und wurden zunächst für virale Erreger gehalten, da eine Kultivierung auf üblichen Nährböden nicht gelang (SELBITZ, 2015). Später fasste man sie als pleuropneumonia-like organisms (PPLO) zusammen (EDWARD & FREUNDT, 1956; SELBITZ, 2015). Mykoplasmen zählen heute zu der Klasse der *Mollicutes* (*Weichhäutigen*), wo sie sich über die Ordnung *Mycoplasmatales* und die Familie *Mycoplasmataceae* schließlich im Genus *Mycoplasma* wiederfinden (TULLY et al., 1993; VALENTIN-WEIGAND, 2015). Durch das Fehlen einer Zellwand bildet die Klasse der *Weichhäutigen*, neben den grampositiven, gramnegativen und obligat intrazellulären Bakterien, eine eigene Gruppe innerhalb der vier Hauptgruppen bakterieller Erreger (VALENTIN-WEIGAND, 2015; JACOBS, 2016). Zeitweilig ordnete man zellwandlose Bakterien dem Stamm der *Firmicutes* zu, gliederte diese aber wieder aus und zählt sie heute zum Stamm der *Tenericutes* (VALENTIN-WEIGAND, 2015). In der Ordnung *Mycoplasmatales* finden sich auch die anderen medizinisch relevanten zellwandlosen Bakterien. Für die Tierart Schwein sind dies neben *Mycoplasma* (*M.*) *hyopneumoniae* noch *M. hyorhinis*, *M. hyosynoviae* und *M. suis* (ehemals *Eperythrozoon suis*) (VALENTIN-WEIGAND, 2015; PIETERS & MAES, 2019).

#### 1.2. Morphologie

Mykoplasmen sind pleomorphe und mit einem Durchmesser von 0,2-0,3µm sehr kleine Bakterien (JACOBS, 2016). Folglich beschränkt sich auch das Genom auf nur 580-1350kBp (Kilobasenpaare) wodurch Mykoplasmen, um sich autonom vermehren zu können, auf Stoffwechselprodukte ihrer Umgebung zurückgreifen müssen. Daher ist nur eine kommensale bis parasitäre Lebensweise möglich (SELBITZ, 2015; JACOBS, 2016). Dies spiegelt sich wiederum in hohen Ansprüchen bei der

Auswahl geeigneter (Anzucht-)Nährmedien wider (FRIIS, 1975; SELBITZ, 2015). Statt einer Zellwand sind sie lediglich von einer Zytoplasmamembran umgeben, die durch Einlagerung von Sterolen, wie Cholesterin, eine besondere Membranfluidität besitzt und so vielfältigste Gestalten annehmen kann (JACOBS, 2016). Auf der Zytoplasmamembran finden sich wiederum zahlreiche Fibrillen, die eine Verbindung der Mykoplasmen untereinander, aber auch zu Epithelzellen vermitteln können (TAJIMA & YAGIHASHI, 1982).

### 1.3. Epidemiologie

*M. hyopneumoniae* verursacht Erkrankungen in Schweinebeständen nahezu jeden Landes, mit Ausnahme der Schweiz, welche dank eines nationalen Eradikationsprogrammes nahezu frei von *M. hyopneumoniae* ist (STÄRK et al., 2007; PIETERS & MAES, 2019). In Deutschland wird *M. hyopneumoniae* als endemisch verbreitet angesehen und geschätzt, dass über 90% aller Bestände infiziert sind (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Angaben hierzu variieren in der Literatur: Im Jahr 2003 untersuchten GROSSE BEILAGE et al. (2009) deutsche Sauenbestände auf das Vorkommen von *M. hyopneumoniae*. Hierzu wurden willkürlich aus 266 Betrieben, ohne klinische Statuserhebung (Vorauswahl), 67 ausgewählt und in jedem dieser Betriebe mindestens 14% serokonvertierter Sauen festgestellt (GROSSE BEILAGE et al., 2009). Auf europäischer Ebene wurden etwa 3 Wochen alte Saugferkel aus *M. hyopneumoniae* positiven Beständen mittels Nasentupfer und PCR (Polymerase-Kettenreaktion) untersucht, wobei in 68% der Betriebe mindestens ein positives Ferkel ausgemacht wurde und in Summe ca. 11% aller Saugferkel positiv auf *M. hyopneumoniae* getestet wurden (VILLARREAL et al., 2010). DEFFNER (2020) untersuchte Sauen, deren Ferkel und Schweine nachgelagerter Produktionsstufen auf das Vorkommen von *M. hyopneumoniae*. Sie konnte bei 54% der Sauen und bei 47,4% der Ferkel, beziehungsweise bei neun von zehn in die Untersuchung eingeschlossenen Beständen, spezifische Immunglobulin G (IgG)-Antikörper detektieren. Hierbei stammten 54,2% der seropositiven Ferkel auch von seropositiven Sauen ab. Interessanterweise fand DEFFNER (2020) mittels PCR nur in 4% der Larynx-tupfer (LT)

untersuchter Sauen und 0,6% der Tracheobronchialtupfer (TBS) von Ferkeln *M. hyopneumoniae* spezifische Genomfragmente. In nachgelagerten Produktionsstufen wurde die höchste Prävalenz (36,9%) in der 20. Lebenswoche (LW) in der Mast mittels oral-fluids (OF) festgestellt (DEFFNER, 2020). Eine Studie aus Belgien und den Niederlanden untersuchte Bestände auf Prävalenzen von *M. hyopneumoniae* in TBS und hatte bei 7,1% der 3-5 Wochen alten Absetzferkeln und bei 10,9% der 6-11 Wochen alten Läufer positive PCR Ergebnisse (VANGROENWEGHE et al., 2015). Insgesamt wurden 27% der 44 untersuchten Schweinebestände positiv getestet (VANGROENWEGHE et al., 2015).

Hinsichtlich der Nachweisrate von *M. hyopneumoniae* in Bezug zum Alter von Schweinen wird deutlich: Je häufiger eine Zuchtsau belegt wird und älter sie im konventionellen Produktionskreislauf wird, desto geringer erscheint das Risiko für sie *M. hyopneumoniae* zu beherbergen (CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000). In einer Studie von CALSAMIGLIA und PIJOAN (2000) sank die Anzahl der Sauen, in welchen mittels PCR in Nasentupfern (NT) *M. hyopneumoniae* nachgewiesen werden konnte. Von anfangs 52% bei Jungsauen fiel die Prävalenz ab auf 39% und 35% bei Paritäten 2-4 und 5-7 bis schließlich nach 8 Würfen keine positiven Tiere mehr gefunden werden konnten. Dennoch kann sich eine Infektion in einer Zuchtherde halten, da es durch stetige Eingliederung von Jungsau zu einem permanenten infektionserhaltenden Erregeraustausch zwischen Sauen der Stammherde und Jungsauen kommt (FANO et al., 2005; PIETERS & MAES, 2019). Zwar konnte noch keine vertikale Infektion in utero beobachtet werden, jedoch können Muttertiere über Nasensekrete den Erreger ausscheiden und so ihre Nachkommen infizieren (CALSAMIGLIA & PIJOAN, 2000; FANO et al., 2007; NATHUES et al., 2013; PIETERS & MAES, 2019). Die Anzahl infizierter Ferkel während des Absetzens kann maßgeblich das Krankheitsbild der EP am Lebensende von Mastschweinen bestimmen (FANO et al., 2007). Ausgehend von einigen wenigen infizierten Tieren dauert es mitunter Wochen bis sich der Erreger in einer ganzen Gruppe ausgebreitet hat (MEYNS et al., 2004; VILLARREAL et al., 2011; ROOS et al., 2016). Bei höherem Infektionsdruck

kann sich eine Ausbreitung deutlich rasanter vollziehen (MAROIS et al., 2007).

Der Zeitpunkt einer klinischen Manifestation ist variabel und von vielen Faktoren abhängig. So kann beispielsweise in Systemen mit Rein-Raus-Verfahren und/oder geographisch und nach Alter der Tiere getrennten Produktionsstufen eine temporäre Unterbrechung der Infektionsketten stattfinden und so zu einer späteren Etablierung von Krankheitssymptomen erst am Ende der Mast führen (SIBILA et al., 2004).

*M. hyopneumoniae* ist in der Luft nachweisbar (STÄRK et al., 1998) und Infektionen über den Luftweg sind, insbesondere über kurze Distanzen (FANO et al., 2005) und während günstigen Wetterverhältnissen, wie sie in kühleren, nassen Jahreszeiten vorherrschen, möglich (JORSAL & THOMSEN, 1988). Dadurch kann es zu signifikanten jahreszeitlichen Unterschieden im Verlauf eines Jahres innerhalb der Prävalenz eines Bestandes kommen (VANGROENWEGHE et al., 2015). Im Modell konnte die aerogene Verbreitung über 150 m (CARDONA et al., 2005) und im Feldversuch über 9,2 km mittels PCR-Nachweis gezeigt werden (OTAKE et al., 2010).

#### **1.4. Pathogenese**

Eine chronische Besiedelung der Epithelien luftleitender Atemwege, eine ausgedehnte Entzündungsreaktion, mit einerseits Unterdrückung und andererseits Modulation der angeborenen und erworbenen Immunantwort, und letztlich das Zusammenspiel mit weiteren Erregern bestimmen die Pathogenese einer Infektion mit *M. hyopneumoniae* (PIETERS & MAES, 2019). Der Zelltropismus zu Epithelzellen der Atemwege ist diagnostisch von großer Bedeutung, wenngleich experimentell Erreger auch in anderen Organen wie Leber, Milz und Nieren nachgewiesen werden konnten (THACKER, 2004; LE CARROU et al., 2006; MAROIS et al., 2007). Über die Atmung wird *M. hyopneumoniae* in die Atemwege gesogen und durchdringt hier die Schleimschicht des respiratorischen Epithels in Trachea, Bronchien und Bronchiolen, um, ausgehend von den Spitzen der Zilien, kleine Kolonien zu bilden (BLANCHARD et al., 1992; JACQUES et al., 1992; PIETERS & MAES, 2019).

Folglich wird der Selbstreinigungsmechanismus der Atemwege (mukoziliäre clearance, MCC) gestört. Dies geschieht durch Ziliostase und Ablösen von Zilien bis hin zum völligen Untergang des Flimmerepithels (JACQUES et al., 1992). REINER (2015) beschreiben dies als einen „Pfortnereffekt“ für sekundäre Erreger. Dieser wird zudem initiiert durch die Ausschüttung des Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- $\alpha$ ) und von Interleukin-10 (IL10), welche einerseits die Entzündungsreaktion fördern und andererseits die Immunabwehr des Tieres unterdrücken (REINER, 2015). Der Adhäsionsprozess ist komplex und noch nicht vollständig verstanden. Sicher ist jedoch, dass eine Vielzahl von Adhäsinen auf der Oberfläche von *M. hyopneumoniae* daran beteiligt sind (PIETERS & MAES, 2019). So werden beispielsweise nach posttranslationalen Proteinmodifikationen Fragmente des Adhäsins P97 durch *M. hyopneumoniae* präsentiert und tragen zu einer Bindung an die Zilien des Wirtes bei (DJORDJEVIC et al., 2004; ADAMS et al., 2005). Eine entscheidende Rolle für die Virulenz könnten Spaltprodukte des vom paralogen Gen stammenden Protein P102 einnehmen, welche Plasminogen binden und Fibrinogen spalten können (MINION et al., 2004; SEYMOUR et al., 2012).

Das Immunsystem wird von *M. hyopneumoniae* auf mehrere Weisen beeinflusst. RODRIGUEZ et al. (2004) zeigten in einer Untersuchung, dass durch *M. hyopneumoniae* aktivierte Zellen des Immunsystems, wie Makrophagen und Lymphozyten, mittels Ausschüttung immunmodulatorischer Substanzen (Zytokine) eine Hyperplasie des BALT (bronchus-associated lymphoid tissue) bewirken. Das Ausmaß dieser Entzündungsreaktion kann mit der Virulenz des jeweiligen Mykoplasmenstammes korrelieren (MEYNS et al., 2007). Gleichzeitig wird durch Prostaglandine die Aktivität neutrophiler Granulozyten (PMN) und die Phagozytoseleistung der Makrophagen, welche in das betroffene Gewebe schwärmen, reduziert (CARUSO & ROSS, 1990; ASAI et al., 1996).

Ob und mit welcher Heftigkeit sich eine Pneumonie als Folge einer Mykoplasmeninfektion manifestiert, unterliegt dem Zusammenspiel vieler Aspekte in einem multifaktoriellen Krankheitsgeschehen (PIETERS & MAES, 2019). So sind die Infektionsdosis, die individuelle Virulenz und die



Replikationsfreudigkeit des jeweiligen *M. hyopneumoniae*-Stammes relevant für das Ausmaß der Reduktion der MCC, was wiederum als Türöffner für sekundäre Erreger zu verschiedenen klinischen Bildern führen kann (CIPRIAN et al., 1988; THACKER et al., 1999; THACKER et al., 2001; OPRIESSNIG et al., 2004; MEYNS et al., 2007; WOOLLEY et al., 2012; PIETERS & MAES, 2019).

### 1.5. Klinischer Verlauf

Schweine jeder Alters- und Produktionsstufe sind anfällig für eine Erkrankung durch *M. hyopneumoniae*, welche meist endemisch auftritt (NATHUES et al., 2014; PIETERS & MAES, 2019). Monoinfektionen verlaufen vorwiegend subklinisch und äußern sich in einem chronischen, trockenen Husten mit reduzierter Futterverwertung und folglich Einbußen in der Mastleistung (SIBILA et al., 2009; SELBITZ, 2015). Der typische Husten kann durch Auftreiben der Tiere provoziert werden und befällt schleichend, ausgehend von einigen wenigen Schweinen, allmählich das gesamte Abteil, kann dann aber entweder abklingen oder bis zur Schlachtreife fortbestehen (SIBILA et al., 2009; PIETERS & MAES, 2019). Als Haupterreger der Enzootischen Pneumonie (EP) verantwortet *M. hyopneumoniae*, im Zusammenspiel mit anderen bakteriellen Erregern wie *Pasteurella multocida* (AMASS et al., 1994), *Actinobacillus pleuropneumoniae* (MAROIS et al., 2009), *Glaesserella parasuis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Trueperella pyogenes* und *Streptococcus spp.*, global große wirtschaftliche Verluste in der Schweineproduktion (SIBILA et al., 2009; PIETERS & MAES, 2019). Weiterhin können Fieber, Dyspnoe und Todesfälle auftreten (MAES et al., 1996). Die Infektion des Schweines mit zusätzlich viralen Pathogenen, wie dem porzinen reproduktiven und respiratorischen Syndrom Virus (PRRSV), porzinen Circovirus Typ 2 (PCV2) und Schweineinfluenzavirus (SIV), beschreibt der porcine respiratory disease complex (PRDC), der ebenfalls variable Verläufe nehmen kann (BOCHEV, 2007; PIETERS & MAES, 2019). VAN ALSTINE et al. (1996) konnten in ihrem Versuchsmodell keine Potenzierung von *M. hyopneumoniae* und PRRSV feststellen. Drei Jahre später wurden in einer anderen Untersuchung nach Inokulation beider Erreger deutlich schwerere Verläufe beobachtet als bei Monoinfektionen der

Kontrollgruppen (THACKER et al., 1999). In einer Studie, die die Verstärkung der Klinik durch Ko-Infektionen mit dem SIV untersuchte, wurde nur temporär eine verstärkte Symptomatik beobachtet (THACKER et al., 2001), welche vom Subtyp des Virus abhängig sein kann (DEBLANC et al., 2012). OPRIESSNIG et al. (2004) infizierten Schweine gleichzeitig mit *M. hyopneumoniae* und PCV2. Diese Tiere zeigten, im Vergleich zu ausschließlich mit *M. hyopneumoniae* oder PCV2 infizierten Tieren, deutlich schwerere respiratorische Symptome, eine verlängerte Infektionsdauer mit höherer Viruslast, Potenzierung der PCV2 assoziierten Lungenläsionen sowie ein vermehrtes Auftreten des postweaning multisystemic wasting syndroms (PMWS) (OPRIESSNIG et al., 2004). Konträr dazu stellten SIBILA et al. (2012) keine Interaktion zwischen diesen beiden Erregern fest.

Über die genannten Pathogene hinaus spielen Jahreszeiten, Herdencharakteristika und –management, bauliche Gegebenheiten wie Lüftung und Abteilgröße oder geographische Lokalisationen für Verläufe und Ausprägungen von respiratorischen Erkrankungen des Schweines eine beachtenswerte Rolle (STÄRK, 2000).

## 2. Diagnostik

*M. hyopneumoniae* verursacht zwar für EP-typische Läsionen, jedoch werden keine pathognomonischen mikroskopischen oder makroskopischen Veränderungen ausgebildet, da andere respiratorische Krankheitserreger Pneumonien mit ähnlicher Morphologie verursachen können (LIN et al., 2006; PIETERS & MAES, 2019). Die Diagnose einer EP kann nicht anhand einzelner Befunde festgemacht werden, sondern erfordert die Kombination verschiedener diagnostischer Verfahren (THACKER, 2004; HILLEN et al., 2014). Des Weiteren sollte für eine erfolgsversprechende Diagnostik ein exaktes Ziel definiert werden, da unterschiedliche Wege, beispielsweise für die Abklärung des Herdenstatus oder zur Prüfung des Infektionszeitpunktes, eingeschlagen werden müssen (THACKER, 2004). Nicht-infektiöse Faktoren wie örtliche und bauliche Gegebenheiten, die die Entwicklung einer EP begünstigen können, stellen zudem ein breites Ursachenfeld dar (STÄRK, 2000). Die

ubiquitäre Verbreitung von *M. hyopneumoniae* in Schweinebeständen weltweit und die nahezu flächendeckende Impfung von Tieren erschweren es zusätzlich die gefundenen Krankheitserreger in einen klinischen Zusammenhang einzuordnen. Mithilfe von intraläsionalen Nachweisverfahren von *M. hyopneumoniae* können die Bakterien direkt im Zusammenhang mit den durch sie verursachten Läsionen dargestellt werden und sind deshalb von besonderer diagnostischer Bedeutung. Die Basis der Diagnostik bei der Verdachtsdiagnose EP besteht meist aus der Triage Klinik, Pathomorphologie und Erregernachweis (THACKER, 2004; PIETERS & MAES, 2019). Nur die gezielte und genaue diagnostische Aufarbeitung kann das ätiologische Agens einer Erkrankung präsentieren und bildet damit die Grundvoraussetzung in der Bestandsbetreuung für alle weiteren therapeutischen, aber auch prophylaktischen Maßnahmen.

### **2.1. Klinik**

Trockener Husten am Ende der Mast wird als Leitsymptom für die EP betrachtet (NATHUES et al., 2012; PIETERS & MAES, 2019). Jedoch ist dieser einerseits nicht sehr spezifisch, andererseits zeigen subklinisch infizierte Tiere diesen nicht (SIBILA et al., 2009). Wird im Allgemeinen dem molekularbiologischen Erregernachweis noch mehr Aussagekraft zugesprochen, so kamen NATHUES et al. (2012) zu dem Schluss, dass Quantifizierung und Beginn des typischen Hustens die EP Diagnostik nicht nur unterstützend verbessern, sondern sogar teilweise herkömmliche PCR-Techniken, insbesondere am Ende der Mast, ersetzen könnten. Durch den folglich erheblich verringerten personellen und zeitlichen Aufwand könnte die Diagnostik deutlich vereinfacht, günstiger und praktikabler werden. Hinweisend für das Maß an wirtschaftlichen Verlusten kann der Beginn des Hustens sein: Je früher dieser auftritt, desto größer werden die Differenzen im Schlachtgewicht mit gleichaltrigen, nicht hustenden Tieren, was eine verlängerte Mastdauer, verminderte tägliche Zunahmen und schlechtere Futterverwertung impliziert (MORRIS et al., 1995b).

### **2.2. Scoring von Lungenläsionen am Schlachthof**

Die Schlachttierkörperuntersuchung und Fleischbeschau haben historisch ihren Ursprung im Schutz des Menschen vor zoonotischen Gefahren,

ausgehend von Lebensmitteln tierischen Ursprungs. Mittlerweile jedoch ist die schematische Erfassung und Bewertung makroskopischer Veränderungen zur Verbesserung ökonomischer Gesichtspunkte, die eng mit der Tiergesundheit korrelieren, fester Bestandteil geworden (HARLEY et al., 2012). Das quantitative Bewerten von Lungenläsionen am Schlachtband ist ein wertvolles erstes Diagnostikum, um den EP-Status einer Herde zu evaluieren (SIBILA et al., 2009). EP-typische Läsionen sind in Kapitel II.2.6.1 beschrieben. Neben diesen hat sich zum Monitoring respiratorischer Erkrankungen auch die Beurteilung von Pleuritiden sowie ihres Ausprägungsgrades bewährt (DOTTORI et al., 2007). Jedoch sind daraus resultierende Ergebnisse alleine wenig aussagekräftig, da typische Veränderungen auf EP hinweisend, aber nicht pathognomonisch sind, was bedeutet, dass auch andere Erreger, beispielsweise *M. hyorhinis* oder das SIV, ähnliche Läsionen hervorrufen können oder sich eine EP mit verschiedenen Sekundärerregern variabel darstellen kann (THACKER et al., 2001; LIN et al., 2006). Zusätzlich verändern sich makroskopische Läsionen im Verlauf einer EP (NOYES et al., 1990). Nach einem Peak zwischen zwei und vier Wochen können die Veränderungen in ihrem Ausmaß wieder stark abnehmen, weshalb der Infektionszeitpunkt das Ergebnis eines Scorings am Schlachthof beeinflussen kann (SØRENSEN et al., 1997). GARCIA-MORANTE et al. (2016) verglichen in einer Studie Abweichungen zwischen etablierten Systemen zur Ermittlung der kranio-ventralen pulmonalen Konsolidierung (CVPC). Die stärksten Korrelationen fand man bei Methoden, die die prozentual befallene Fläche oder die proportional zum Gesamtgewicht der Lunge befallene Masse evaluierten (GARCIA-MORANTE et al., 2016). MADEC und KOBISCH (1982) entwarfen eine Methode, bei der jeder der sieben Lungenlappen des Schweines (links: Lobus cranialis pars cranialis, Lobus cranialis pars caudalis, Lobus caudalis; rechts: Lobus cranialis, Lobus medialis, Lobus accessorius und Lobus caudalis) einzeln betrachtet wird. Für jedes dieser anatomisch definierten Areale werden, je nach Ausmaß der betroffenen Oberfläche, Punkte vergeben (Tabelle 3). In Summe liefern diese einen Richtwert für die Lungengesundheit sowohl des Einzeltieres als auch, bei stichprobenartiger Untersuchung einer ganzen Charge, auf Herdenebene. Um die unterschiedlichen Anteile der einzelnen Lungenlappen an der

Masse der gesamten Lunge zu berücksichtigen, entwarfen CHRISTENSEN et al. (1999) ein relativiertes Verfahren zur Quantifizierung der Läsionen. In diesem wird jeder Lungenlappen anteilig zu seiner prozentualen Masse an der gesamten Lunge betrachtet. Außerdem wird der kraniale Bereich der Zwerchfelllappen separat vom restlichen Zwerchfelllappen bewertet, da in diesem Lappen fast ausschließlich dort Läsionen vorkommen CHRISTENSEN et al. (1999). Eine von SIBILA et al. (2014) beschriebene Bildanalyse, bei der nur eine Seite der Lunge fotografiert wurde, zeigte die geringste Korrelation mit den anderen verglichenen Beurteilungsschemata, welche durch Verwendung mehrerer Aufnahmen verbessert werden könnte (GARCIA-MORANTE et al., 2016).

### **2.3. Direkter Erregernachweis**

#### **2.3.1. Erregeranzucht**

Der Goldstandard zum direkten Nachweis von *M. hyopneumoniae* ist dessen kulturelle Anzucht. Dies gelingt jedoch nur mit Proben, die auch vermehrungsfähige Erreger enthalten (FRIIS, 1975; PIETERS & MAES, 2019). Aufgrund der eingeschränkten Stoffwechselkapazität und der daraus folgenden kommensalen bis parasitären Lebensweise, stellt *M. hyopneumoniae* hohe Ansprüche an ein Nährmedium. Dieses benötigt den Zusatz mehrerer Supplemente, aber auch Hemmstoffe, damit die sehr langsam wachsenden Mykoplasmen nicht von anderen Bakterien überwuchert werden (SELBITZ, 2015). Das Medium nach FRIIS (1975) stellt ein solches dar. Jedoch wird der praktische diagnostische Wert durch die geringe Sensitivität, die vergleichsweise hohen Kosten und durch das langsame Wachstum von *M. hyopneumoniae* relativiert (PIETERS & MAES, 2019). Die Erregeranzucht kann allerdings auch Informationen bezüglich der Resistenzlage von *M. hyopneumoniae* gegenüber antibakterieller Chemotherapeutika liefern und weist mit diesem Vorteil ein Alleinstellungsmerkmal auf (MAES et al., 2018).

#### **2.3.2. Polymerase-Kettenreaktion**

Die PCR stellt eine geeignete Alternative als direkten Erregernachweis neben der Erregeranzucht mittels Nährmedium dar, wenngleich durch den Nachweis des Genoms nicht zwischen toten und lebensfähigen

Mikroorganismen unterschieden werden kann (DUBOSSON et al., 2004). Durch einen Erregernachweis mittels PCR kann die Diagnostik einer Infektion mit *M. hyopneumoniae*, basierend auf Klinik und Pathologie, besonders zu Beginn und am Ende der Infektion erheblich verbessert werden (DUBOSSON et al., 2004). Die PCR kann gezielt erregerspezifische Nukleinsäuresequenzen durch eine zyklische Abfolge von Denaturierung, Primerhybridisierung und enzymatisch induzierter Amplifikation vervielfältigen (GELDERMANN & SEYFERT, 2005). Mittels Fluoreszenz oder Sequenzierung können so auch kleinste Mengen der gesuchten DNA in einer Probe nachgewiesen werden (GELDERMANN & SEYFERT, 2005). In den 1990er Jahren wurden mehrere PCR basierte Verfahren zum Nachweis von *M. hyopneumoniae* spezifischen genomischen Sequenzen entwickelt (HARASAWA et al., 1991; ARTIUSHIN et al., 1993; MATTSSON et al., 1995; BLANCHARD et al., 1996; CARON et al., 2000). Zur Steigerung der Sensitivität etablierte sich eine optimierte Form, die nested-PCR (nPCR), mit welcher Erbgut auch einzelner Organismen detektiert werden konnte (STÄRK et al., 1998; CALSAMIGLIA et al., 1999; VERDIN et al., 2000; KURTH et al., 2002). Bei dieser Technik folgt auf die Zyklen eines ersten Durchlaufs eine weitere PCR mit neuem Primer, um das entstandene PCR-Produkt erneut zu vervielfältigen (GELDERMANN & SEYFERT, 2005). Von Nachteil kann die erhöhte Gefahr falsch positiver Ergebnisse durch Verunreinigung sein, sodass eine sorgfältige Auswahl des Probenortes und der Probenart, zusammen mit einem weniger sensitiven PCR-Verfahren, repräsentativere Ergebnisse liefern könnte (KURTH et al., 2002). Noch mehr Informationen können quantitative real-time PCR Assays (qPCR) liefern, welche zwischen den Zyklen, durch Anlagerung eines fluoreszierenden Stoffes, bereits die Menge des entstandenen PCR Produkts messen und eine genaue Quantifizierung der replizierten Nukleinsäuren möglich machen (GELDERMANN & SEYFERT, 2005).

Eine besondere Hürde im Einsatz molekularbiologischer Nachweisverfahren stellt die genetische Variabilität innerhalb der einzelnen *M. hyopneumoniae* Isolate dar, wodurch nicht jede PCR jedes Isolat nachweisen kann (STAKENBORG et al., 2005; MAYOR et al., 2007).

Deshalb setzen sich modernere PCR-Assays aus mehreren Primern zusammen (DUBOSSON et al., 2004; STRAIT et al., 2008), wie die von MAROIS et al. (2010) entwickelte triplex qPCR, mit welcher *M. hyopneumoniae* spezifische Genabschnitte dreier Proteine (P46, P97 und P102) gleichzeitig nachgewiesen werden können.

Der Ort der Probennahme und folglich die Art des Probenmaterials, meist oral fluids (OF), Nasentupfer (NT), Larynxtupfer (LT), bronchioalveoläre Lavageflüssigkeit (BALF) oder Lungengewebe, kann für eine erfolgreiche Diagnostik ausschlaggebend sein. Tendenziell gilt jedoch, dass in Proben aus den tiefer gelegenen luftführenden Atemwegen und aus Gewebeproben der Lunge eher *M. hyopneumoniae* nachweisbar ist als dies bei in vivo Probennahmen wie OF oder NT möglich ist (KURTH et al., 2002; MAES et al., 2018; RAWAL et al., 2018; PIETERS & MAES, 2019). In einer Studie zum Vergleich der Probenorte in vivo war der LT der BALF jedoch überlegen (PIETERS et al., 2017).

#### **2.4. Serologie**

Zum Nachweis *M. hyopneumoniae*-spezifischer Antikörper wird meist ein Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) verwendet (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Im Vergleich unterscheiden sich die verfügbaren, gängigen ELISA-Testverfahren hinsichtlich ihrer Genauigkeit kaum (PIETERS et al., 2017). Eine frühere Studie von ERLANDSON et al. (2005) legt jedoch nahe, dass die Aussagekraft serologischer Verfahren insbesondere im frühen Stadium einer Infektion (bis 3 Wochen p.i.) vorsichtig zu interpretieren sind und eine Kombination aus verschiedenen ELISA die Sensitivität erhöhen kann. Zudem kann eine Kontrolle mittels Western Blot die Spezifität verbessern (AMERI et al., 2006). Zurückzuführen ist dies auf variable Zeitpunkte der Infektion und der Serokonversion einer Herde und auch einzelner Tiere, wozu unterschiedliche Ergebnisse veröffentlicht wurden (SHELDRAKE et al., 1990; KOBISCH et al., 1993; MORRIS et al., 1995a; SØRENSEN et al., 1997; ANDREASEN et al., 2000; VICCA et al., 2002; MAROIS et al., 2007; SIBILA et al., 2007). Nach natürlicher Infektion kommt es 3-8 Wochen post expositionem zur Serokonversion (PIETERS & MAES, 2019). Ursächlich für die beschriebenen Diskrepanzen könnte sein, dass *M. hyopneumoniae* die

Atemwege befällt und dadurch die direkte Interaktion zwischen Erreger und systemischer Immunabwehr reduziert ist, woraus eine verminderte humorale Immunantwort resultieren könnte (THACKER, 2004). Zusätzlich könnten variable Antigenstrukturen auf der zellulären Oberfläche von *M. hyopneumoniae* zu variablen Immunantworten führen (YOUNG & ROSS, 1987). Zusammenfassend wird die Spezifität serologischer Nachweisverfahren für *M. hyopneumoniae* verringert durch die variable Zeit bis zur Serokonversion und durch die Tatsachen, dass nicht zwischen maternalen, impfinduzierten oder p.i. gebildeten AK unterschieden werden kann und dass apathogene Mykoplasmenarten zu falsch-positiven Ergebnissen führen können. Dadurch ist die Diagnostik mit diesen Verfahren anspruchsvoll (PIETERS et al., 2009; PETERSEN et al., 2016; MAES et al., 2018). In Anbetracht der Tatsache, dass Impfungen gegen *M. hyopneumoniae* weltweit zum Einsatz kommen (MAES et al., 2018) erscheinen serologische Screenings zum Erregernachweis nur sinnvoll in ohnehin *M. hyopneumoniae* freien Regionen wie beispielweise der Schweiz (STÄRK et al., 2007).

In einem Modellversuch von THACKER et al. (1999) konnte gezeigt werden, wie eine Ko-Infektion aus *M. hyopneumoniae* und PRRSV zu höheren AK-Titern gegen *M. hyopneumoniae* führte. Die gemessenen AK-Konzentrationen nach einer Impfung können nicht mit einem zu erwartenden Schutz vor verringerter Mastleistung oder Lungenveränderungen durch eine Infektion mit *M. hyopneumoniae* gleichgesetzt werden (DJORDJEVIC et al., 1997; THACKER et al., 1998). Häufige Anwendung finden ELISA-Tests, dank der kostengünstigen, automatisierten und schnellen Durchführung, vor allem beim Erheben des Antikörperstatus auf Herdenebene sowie dem Ermitteln des individuellen bestandsspezifischen Infektionszeitpunktes (SIBILA et al., 2009). Da die Hauptquelle einer Infektion mit *M. hyopneumoniae* in ehemals negativen Beständen im Zukauf positiver Tiere zu sehen ist, ist die Erforschung diagnostischer Protokolle im Frühstadium der Erkrankung von überragender Bedeutsamkeit (MAES et al., 2018).



## 2.5. Intraläsionaler Errgernachweis

Die In-situ-Hybridisierung (ISH) erlaubt es Informationen von besonderem Wert über Mikroorganismen bezüglich Lokalisation, Morphologie und klinischer Relevanz zu sammeln, da Genomabschnitte der Mikroorganismen mittels Sonde intraläsional dargestellt werden können (BOYE et al., 2001). Neben der ISH kann auch die Immunhistochemie (IHC) ursächliche Pathogene am Ort ihrer Läsionen erkennbar machen. Dennoch konnten sich beide Verfahren in den meisten Laboren bisher nicht als Standardnachweismethoden für *M. hyopneumoniae* etablieren (PEREIRA et al., 2017; PIETERS & MAES, 2019).

### 2.5.1. In-situ-Hybridisierung (ISH) und Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Bei einer ISH lagern sich komplementäre, radioaktive oder fluoreszierende RNA- oder DNA-Sonden an eine Zielsequenz an (hybridisieren) und machen diese im Zellausstrich oder im histologischen Schnitt sichtbar (WELSCH et al., 2018). Fluoreszenzfarbstoffe haben hierbei den Vorteil, dass sie schnell anzuwenden sind und mehrere Nukleotidsequenzen in einer Probe, durch den Einsatz unterschiedlicher Farbstoffe, parallel nachgewiesen werden können (GELDERMANN, 2005). Alternativ kann die Sonde auch mit dem Steroid Digoxigenin gekoppelt werden. Hierbei werden mithilfe von Anti-Digoxigenin-Antikörpern und einer anschließenden enzymatisch induzierten Farbreaktion hybridisierte Sonden visualisiert (KOMMINOTH, 1992).

KWON und CHAE (1999) gelang es mit einer DNA-Sonde, markiert mit Digoxigenin, *M. hyopneumoniae*-spezifisches Erbgut in histologischen Schnitten nachzuweisen. Verwendet wurde eine Sonde, welche auf ein 520 Basenpaar (bp) langes Fragment ausgerichtet war. Basierend auf klinischen und pathologischen Befunden wurden 20 Schweine zwischen dem 24. und 120. LT aus 10 Herden ausgewählt, welche sich alle natürlich mit *M. hyopneumoniae* infiziert hatten. Bei jedem Tier konnten ISH-Signale beobachtet werden. Als Ursache für Unterschiede in der Quantität und Lokalisation dieser Signale diskutierten KWON und CHAE (1999) eine mangelnde Sensitivität aufgrund phylogenetischer Unterschiede einzelner *M. hyopneumoniae* Stämme. Auch könnten

unterschiedliche Infektionszeitpunkte und damit, aufgrund natürlicher Infektion, verschiedene Infektionsdauern zum Zeitpunkt der Probennahme ursächlich sein. Dennoch wird die verwendete Sonde als spezifisch und diagnostisch sinnvoll erachtet (KWON & CHAE, 1999).

WEISBURG et al. (1989) führten anhand der 16S ribosomalen RNA (rRNA) eine phylogenetische Analyse an zahlreichen Mykoplasmenarten durch. Erkenntnisse aus Analysen, basierend auf DNA-DNA Hybridisierungen (RAZIN, 1985), konnten dadurch bestätigt und ergänzt werden (WEISBURG et al., 1989). Neben AMANN et al. (1995), der dieser Ribonukleinsäure in der phylogenetischen Identifikation eine besondere Gewichtung zuteilwerden lässt, bezeichnete WOESE (1987) die 16S rRNA als „ultimatives Chronometer“ bei der Klärung evolutionärer Fragen auf der Suche nach prokaryotischen Ursprüngen. Diese Spezifität machte sich eine Forschergruppe aus Japan zunutze und entwarf eine Hybridisierungssonde, komplementär zur 16S rRNA (FUTO et al., 1992). Zur Visualisierung der markierten *M. hyopneumoniae*-DNA wurde das Radionuklid <sup>23</sup>Phosphor verwendet, da mit nicht-radioaktiven, chemilumineszenzbasierten Verfahren die Sensitivität in diesem Versuch um den Faktor 10 abnahm (FUTO et al., 1992). Durch Verknüpfen von Oligonukleotid-Sonden mit Fluoreszeinisothiozyanat entwickelten BOYE et al. (2001) eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) frei von radioaktiver Strahlung. In Formalin fixierten Gewebeproben konnten sie, durch Nachweis von 16S rRNA-Sequenzen, verschiedene Mykoplasmen spp. unterscheiden. Dies gelang sowohl bei Gewebeproben von experimentell infizierten Tieren, als auch bei verschiedenen Geweben aus Feldinfektionen (BOYE et al., 2001; PEREIRA et al., 2017). Die für die unterschiedlichen Mykoplasmen spp. verwendeten Sonden wurden als hochspezifisch bewertet. Des Weiteren konnte im direkten Vergleich zu einer IHC gezeigt werden, dass die ISH in Bezug auf die Spezifität deutlich überlegen ist (PEREIRA et al., 2017). Gleichzeitig wurde, bei ausreichender Erregerlast im Gewebe, auch eine praxistaugliche Sensitivität erreicht (BOYE et al., 2001).

### 2.5.2. Lokalisation von *M. hyopneumoniae* im Gewebe

Elektronenmikroskopisch konnte eine Affinität von *M. hyopneumoniae* zum Flimmerepithel beobachtet werden (BLANCHARD et al., 1992). Zudem stellen die Epithelien der Atemwege den Ort der Vermehrung von *M. hyopneumoniae* dar (BLANCHARD et al., 1992). Mittels ISH konnte *M. hyopneumoniae* besonders luminal auf den Epithelien der Bronchien und Bronchiolen nachgewiesen werden (KWON & CHAE, 1999; KWON et al., 2002). Deutliche Signale auf diesen Epithelien waren assoziiert mit einer BALT-Ausbildung um die jeweiligen Bronchien und Bronchiolen (KWON et al., 2002). Vergleichsweise schwächere Signale fand man in Makrophagen des interstitiellen Gewebes sowie der Alveolen und vereinzelt in Pneumozyten (KWON & CHAE, 1999; KWON et al., 2002). Zudem deutete sich in einer chronologischen Untersuchung über 7-35 Tage p.i. an, dass sich die Verteilung von *M. hyopneumoniae* im Gewebe im Verlauf einer Infektion verändert (KWON et al., 2002). Auf dem Flimmerepithel zeigten sich auch immunhistochemisch starke Signale als Folge von Antikörperreaktionen mit *M. hyopneumoniae* (SARRADELL et al., 2003; OPRIESSNIG et al., 2004; REDONDO et al., 2009). Zudem konnte, konträr zu anderen Studienergebnissen, *M. hyopneumoniae*-Antigen innerhalb der BALT-Follikel nachgewiesen werden, was auf unterschiedliche *M. hyopneumoniae* Stämme zurückzuführen sein könnte (REDONDO et al., 2009). Bei einer Ko-Infektion von *M. hyopneumoniae* und PCV2 zeigte eine immunhistochemische Untersuchung, dass vor allem in den Zellen der BALT-Hyperplasie, welche durch *M. hyopneumoniae* induziert wird, zwar große Mengen PCV2-Antigen, jedoch keine Mykoplasmen zu finden sind (OPRIESSNIG et al., 2004). 35 Tage nach der experimentellen Infektion der Tiere konnte im Lungenparenchym kein *M. hyopneumoniae* mehr nachgewiesen werden, sodass von einem Rückgang der Anzahl an *M. hyopneumoniae* im Gewebe zwischen 28-35 Tage p.i. ausgegangen werden kann (REDONDO et al., 2009). Mykoplasmen werden historisch als extrazelluläre Bakterien betrachtet, jedoch konnte in einem Modell an PK-15 Zelllinien nachgewiesen werden, dass *M. hyopneumoniae* im Stande ist, sich mittels Endozytose in eine Wirtszelle zu begeben (RAYMOND et al., 2018). Zugleich gelang die Isolierung von *M. hyopneumoniae* mittels Friis Agar aus Tieren, welche

zuvor mit einer Gentamicindosis, ausreichend um extrazelluläre Erreger zu eliminieren, behandelt wurden. Dieser Umstand bekräftigt die Vermutung dieser Forschergruppe zusätzlich (RAYMOND et al., 2018).

### **2.5.3. Immunhistochemie (IHC) und Immunfluoreszenz-Assay (IFA)**

Post-mortem (p.m.) können antigene Strukturen von *M. hyopneumoniae* durch IHC oder IFA mithilfe fluoreszierender Stoffe auf Basis der Antikörper-Antigenreaktion sichtbar gemacht werden (SIBILA et al., 2009). Beide Verfahren gelten insofern als limitiert, da nur kleine Stellen aus Lungenproben untersucht werden können (CAI et al., 2007) und die Qualität des Tests stark von der Spezifität der verwendeten Antikörper (AK) abhängt, welche auch an andere Mykoplasmen spp. binden könnten (CHEIKH SAAD BOUH et al., 2003). Die Untersuchungsergebnisse von Proben können durch schlachtttechnisch bedingte Zerstörung des Flimmerepithels verfälscht werden und zu falsch-negativen Ergebnissen führen (PIETERS & MAES, 2019). Die IFA benötigt zudem besondere Gefrierschnitte, die das Risiko bergen morphologische Eigenschaften durch Artefakte zu verschleiern (THACKER, 2004).

## **2.6. Makroskopische und pathohistologische Untersuchungsbefunde**

Makroskopische, mit bloßem Auge sichtbare Läsionen und die Beschreibung des pathomorphologischen Bildes bilden zentrale diagnostische Standbeine bei der Aufarbeitung respiratorischer Erkrankungen beim Schwein. Hierbei erfolgt meist im ersten Schritt eine Beurteilung der Lungenläsionen im Zuge der Schlachttierkörperuntersuchung als Teil der Überwachung der Herdengesundheit im Allgemeinen (MAES et al., 2018). Im Anschluss daran wird eine mikroskopische Exploration der pathohistologischen Veränderungen durchgeführt (THACKER, 2004).

### **2.6.1. Makroskopische Läsionen**

Bereits eine Woche post infectionem (p.i.) können makroskopische Veränderungen an der Lunge sichtbar werden (UNDERDAHL et al., 1980; KOBISCH et al., 1993). Diese erreichen ihren Höhepunkt nach etwa vier Wochen p.i. (KOBISCH et al., 1993; PIETERS & MAES, 2019).

Veränderungen können auf die Spitzenlappen beschränkt sein oder über die Mittellappen bis in die Zwerchfelllappen reichen (GROSSE BEILAGE et al., 2013). Sind keine Sekundärerreger beteiligt, können die Läsionen auch fokal vorliegen (THACKER, 2004). Veränderte Areale erscheinen lila-grau und heben sich gut vom restlichen Lungengewebe ab (GROSSE BEILAGE et al., 2013; RODRÍGUEZ et al., 2016; PIETERS & MAES, 2019). Im Anschnitt sind solche Areale konsolidiert und die Schnittflächen feucht (MAES et al., 1996; PIETERS & MAES, 2019). Anatomisch werden die Lungenlappen beim Schwein durch ausgeprägtes interstitielles Gewebe in zahlreiche kleine Läppchen unterteilt (LIEBICH & ZENGERLING, 2010). Liegen dunklere, atelektatische direkt neben emphysematös veränderten Lungenläppchen, kann es zu einem schachbrettartigen Muster kommen (GROSSE BEILAGE et al., 2013), das auch nach einer Genesung 10 Wochen p.i. bestehen bleiben kann (KOBISCH et al., 1993). Findet keine Sekundärinfektion statt, beginnt nach 8 Wochen p.i. die Heilungsphase, sodass zwei Wochen später kaum mehr makroskopische Veränderungen sichtbar sind (MAES et al., 1996). Durch Ko-Infektionen, wie beispielsweise *Actinobacillus pleuropneumoniae*, kann eine hochgradige Pleuritis zu einer Maskierung des ursächlichen Krankheitsbildes führen und die auf der Makroskopie basierende Diagnostik erschweren (SIBILA et al., 2009).

### 2.6.2. Mikroskopische Läsionen

*M. hyopneumoniae* ruft eine besondere Form der bronchointerstitiellen Pneumonie hervor, bei welcher das histologische Bild von mononukleären Zellen geprägt wird, die das alveoläre Interstitium infiltrieren und sich rund um luftführende Anteile des Respirationstraktes ansammeln (CASWELL & WILLIAMS, 2016). Mikroskopische Läsionen verändern sich im Laufe des Krankheitsgeschehens und können in vier Stufen unterteilt werden: Frühe Läsionen mit PMN im Lumen der Alveolen, die gemeinsam mit Lymphozyten beginnen Gefäße und Luftwege zu umrahmen; 7-28 Tage nach Infektion, im zweiten Stadium, füllen sich die Alveolen mit Makrophagen und PMN. Als Folge geschädigter alveolärer Septen kommt es zur Pneumozyten Typ II Hyperplasie und BALT befindet sich in Anbildung; in der dritten Phase, 17-40 Tage p.i., prägen massive BALT-

Akkumulationen das Bild; späte Läsionen treten im Zuge der Rehabilitation 69-210 Tage p.i. auf. Zahlreiche BALT-Anhäufungen haben sich zu Knoten organisiert und komprimieren das Lumen der Bronchien und Bronchiolen (CASWELL & WILLIAMS, 2016; PIETERS & MAES, 2019). Auf Basis der lymphoplasmazellulären Infiltrate, BALT- und Pneumozyten Typ II Hyperplasie können histologische Scoringsysteme zur Erfassung der Befunde aufgestellt (LIVINGSTON et al., 1972; MORRIS et al., 1995a; CALSAMIGLIA et al., 2000; VICCA et al., 2003; OPRIESSNIG et al., 2004; VILLARREAL et al., 2009) und die Veränderungen als typisch für *M. hyopneumoniae* angesehen werden (CALSAMIGLIA et al., 2000; VILLARREAL et al., 2009). Im bereits beschriebenen zeitlichen Verlauf einer Infektion mit *M. hyopneumoniae* betrachtet sind diese jedoch unspezifisch. THACKER et al. (1999) untersuchten Schweine mit *M. hyopneumoniae* und PRRSV (Ko-) Infektionen und quantifizierten die durch *M. hyopneumoniae* hervorgerufenen Läsionen anhand der BALT Ausprägung mittels eines Punktesystems von 0-4 Punkten, wobei eine Ko-Infektion mit PRRSV zu einer verstärkt ausgeprägten Pneumozyten Typ II Hyperplasie führte. In den Alveolen *M. hyopneumoniae* infizierter, spezifisch pathogenfreier (SPF) Schweine konnten Flüssigkeit (Ödem) mit PMN, Makrophagen und Lymphozyten beobachtet werden (BLANCHARD et al., 1992). SIBILA et al. (2007) zogen zum Klassifizieren mikroskopischer Befunde ein System heran, welches einen diagnostischen Cut-off Wert liefert und so diagnostisch auf EP hinweisend sein kann. In Anlehnung an Erkenntnisse vorangegangener Studien wurden die Punkte 0, 1 und 2 für keine oder für *M. hyopneumoniae* unspezifische Entzündungen vergeben; 3 Punkte für Pneumozyten Typ II Hyperplasie, alveoläres Ödem mit Entzündungszellinfiltraten und peribronchialen und perivaskulären lymphoplasmazellulären Zellhyperplasien; 4 Punkte, wenn sich BALT Knötchen zeigten (LIVINGSTON et al., 1972; MORRIS et al., 1995a; CALSAMIGLIA et al., 2000). Wurden histologische Proben mit 3 oder 4 Punkten bewertet, wurden jene als suggestiv für EP eingestuft (CALSAMIGLIA et al., 2000). In einer Infektionsstudie zur Untersuchung möglicher Wechselwirkungen von PCV2 und *M. hyopneumoniae* verwendeten OPRIESSNIG et al. (2004) eine deskriptive, semiquantitative Methode, bei welcher sie verschiedenen Entzündungsqualitäten Punkte

zuordneten: 0: Normalbefund; 1, 3, 5 für multifokal geringgradig / mittelgradig / hochgradig; 2, 4, 6 für diffus geringgradig / mittelgradig / hochgradig. Zwischen der Kontrollgruppe und den *M. hyopneumoniae* infizierten Tieren konnte in allen der in Tabelle 1 aufgeführten Punkte signifikante Anstiege aufseiten der infizierten Tiere ermittelt werden (OPRIESSNIG et al., 2004).

Das genaue Bild einer histologischen Probe zu beschreiben, erlaubt es dem Untersucher, das Spektrum an Differentialdiagnosen einzugrenzen und eine möglichst effektive Auswahl an weiteren Tests einzuleiten (CASWELL & WILLIAMS, 2016). Insbesondere bei der Einzeltierdiagnostik jedoch müssen mikroskopische Befunde in einem Kontext aus Klinik und makroskopischer Pathomorphologie betrachtet werden (MORRIS et al., 1995a). Da sich die Pathohistologie durch Beteiligung weiterer Erreger, wie oben beschrieben, verändern kann, sind in Tabelle 1 Mischinfektionen mit *M. hyopneumoniae* und weiteren Pathogenen nicht berücksichtigt worden, wenngleich diesen in der Praxis in Form einer EP oder als PRDC die größte Bedeutung zuteilwird (MAES et al., 1996; BOCHEV, 2007).

**Tabelle 1: In der Literatur mit *M. hyopneumoniae* assoziierte mikroskopische Läsionen**

<i>M. hyopneumoniae</i> assoziierte Läsionen	Autoren
BALT-Hyperplasie	(LIVINGSTON et al., 1972; KOBISCH et al., 1993; THACKER et al., 1999; THACKER et al., 2001; MAROIS et al., 2009; CASWELL & WILLIAMS, 2016; RODRÍGUEZ et al., 2016)
Mononukleäre Zellinfiltration der Lamina propria der Bronchien und Bronchiolen	(CIPRIAN et al., 1988; KOBISCH et al., 1993; THACKER et al., 2001; MAROIS et al., 2009; CASWELL & WILLIAMS, 2016; RODRÍGUEZ et al., 2016)
Alveoläres Exsudat/Ödem	(LIVINGSTON et al., 1972; CASWELL & WILLIAMS, 2016)
Alveolarseptenverdickung durch Pneumozyten Typ 2-Hyperplasie	(LIVINGSTON et al., 1972; CASWELL & WILLIAMS, 2016)
Infiltration der Alveolarsepten mit Entzündungszellen	(CIPRIAN et al., 1988; MAROIS et al., 2009; CASWELL & WILLIAMS, 2016; RODRÍGUEZ et al., 2016)

### 2.6.3. BALT-Anbildung und Klassifizierung

Sowohl das Schwein als auch andere Spezies können BALT ausbilden, welches nicht grundsätzlich vorhanden ist, sondern durch eine immunologische Stimulation induziert wird (JERICHO, 1970; PABST & GEHRKE, 1990). Als Folge einer *M. hyopneumoniae* Infektion lassen sich histologisch meist deutliche BALT-Anbildungen finden, welche verstärkt bei jenen Tieren ausgeprägt sind, bei denen vermehrt *M. hyopneumoniae* auf den Epithelien der Bronchien nachgewiesen wird (LIVINGSTON et al., 1972; KWON et al., 2002; SARRADELL et al., 2003; LORENZO et al., 2006).



Die Messung inflammatorischer Zytokine nach einer experimentellen Infektion mit *M. hyopneumoniae* zeigte Korrelationen zwischen deren Gehalt und der Ausprägung von BALT, was nahelegt, dass deren Überproduktion eine wesentliche Rolle in der Ausbildung EP-typischer Läsionen spielt und diese nicht alleinig durch direktes Wirken von *M. hyopneumoniae* entstehen (CHOI et al., 2006).

Beim Schwein besteht ein vollständig ausgebildetes BALT nach FALKENAU (2015) aus 1) Lymphoepithel, 2) einer Follikel-assoziierten Lamina propria, 3) Follikel mit Keimzentrum in Nachbarschaft von Blut- und Lymphgefäßen und 4) einem T-Zellareal mit hochendothelisierten Venolen. In dieser vollausgebildeten Form ist es nur während eines krankhaften Geschehens im Sinne einer EP zu beobachten (FALKENAU, 2015). Das Lymphoepithel ist ein spezialisiertes Epithel, gekennzeichnet durch das Fehlen von Becherzellen und Zilien und durchsetzt von Lymphozyten (HUANG et al., 1990). Das BALT selbst zeigt ein hohes Maß an morphologischer und zellulärer Organisation: Im Keimzentrum des Follikels überwiegen Makrophagen und B-Lymphozyten, wohingegen T-Lymphozyten vorwiegend perifollikulär, in der Lamina propria und im Lymphoepithel immunhistochemisch nachgewiesen werden konnten (SARRADELL et al., 2003).

Die unterschiedlichen Stadien einer BALT-Anbildung sind in Tabelle 2 zusammengefasst (FALKENAU, 2015). Die verschiedenen BALT-Anbildungsgrade sind in der Lunge ungleichmäßig verteilt, wobei mittel- und hochgradige Anbildungen vorwiegend in kranialen Lungenarealen zu beobachten sind (FALKENAU, 2015). Dies spricht für eine stärkere Immunstimulation durch *M. hyopneumoniae* in diesen Bereichen (FALKENAU, 2015). Zeigen Lungen nur geringgradig ausgebildete Stadien, so muss dies im epidemiologischen und produktionstechnischen Zusammenhang gesehen werden. Somit kommt eher ein frühes Stadium einer Infektion in Betracht, als abheilendes BALT, da gezeigt werden konnte, dass dieses erst nach vier Monaten rückläufig ist und *M. hyopneumoniae* eine Nachweisbarkeit in experimentellen Infektionsversuchen von 57-185 Tagen hatte (MAES et al., 1996; SØRENSEN et al., 1997; FANO et al., 2005). Der Schlachttermin der

Mastschweine im konventionellen Produktionsablauf im Alter von ca. 6 Monaten verhindert somit ein Abheilen der BALT-Anbildungen.

**Tabelle 2: BALT-Ausbildungsstadien nach FALKENAU (2015)**

Grad	Menge der Bronchioli mit BALT-Anbildung	BALT-Ausbildung am einzelnen Bronchiolus
Negativ (0)	-	-
Geringgradig (+)	Vereinzelte Bronchioli	Peribronchioläre Lymphozytenansammlungen, darunter mindestens eine Follikelformation
Mittelgradig (++)	Mehrheitlich bis alle Bronchioli	1-2 Follikel
Hochgradig (+++)	Mehrheitlich bis alle Bronchioli	Mehr als 2 Follikel

### 3. Bekämpfung, Prophylaxe und Eradikation

Eine antibakterielle Therapie gegen *M. hyopneumoniae* muss unter Berücksichtigung individueller Erregereigenschaften von *M. hyopneumoniae* (Fehlen einer Zellwand), des nachgewiesenen sekundären Erregerspektrums und der jeweiligen Resistenzlage erfolgen (MAES et al., 2008; SELBITZ, 2015). Tetracycline (Doxicyclin) und Makrolide (Tylosin) sind gängige Antibiotika zur Bekämpfung von Infektionen durch *M. hyopneumoniae*, jedoch ist die Erregerelimination nicht von Dauer (MAES et al., 2008). Metaphylaktischer Einsatz antimikrobieller Wirkstoffe zu strategischen Zeitpunkten, kann zu einer Verbesserung klinischer Symptome führen, allerdings erwies sich eine Impfung als effizienter (LE GRAND & KOBISCH, 1996).

Mittlerweile weltweit, in Deutschland seit 1994, finden diverse Impfstoffe mit verschiedenen Impfstrategien Anwendung in Schweinebeständen (HILLEN et al., 2014). Zunächst Two-Shot Präparate und später auch

One-Shot Impfungen konnten ihren ökonomischen Nutzen im praktischen Einsatz beweisen (MAES et al., 1998; MAES et al., 1999; BACCARO et al., 2006; SIBILA et al., 2007). Bessere Tageszunahmen bei gleichzeitig gesteigerter Futterverwertung, geringere Mortalitätsraten, weniger EP-assoziierte Lungenläsionen und reduzierte klinische Symptome werden in geimpften Populationen beschrieben (MAES et al., 1998; MAES et al., 1999; WILSON et al., 2012). Eine Impfung kann die Erregerlast im Tier senken (WOOLLEY et al., 2014) und so zu weniger klinisch erkrankten Tieren führen (SIBILA et al., 2007), kann aber nicht die Tier-zu-Tier Übertragung in einem hemmenden Ausmaß unterbinden (MEYNS et al., 2006; PIETERS et al., 2010; VILLARREAL et al., 2011).

Die zugrundeliegenden Mechanismen einer Immunität durch eine Impfung sind noch nicht vollständig geklärt (MAES et al., 2008; PIETERS & MAES, 2019). Untersuchungen deuten darauf hin, dass die zelluläre Immunität eine wesentliche Rolle bei einer Immunantwort spielen könnte (THACKER et al., 2000; MARCHIORO et al., 2013). Eine ambivalente Position nehmen Antikörper, insbesondere mukosaassoziierte Immunglobuline A ein, da deren Konzentrationen bei gleichbleibender Verbesserung ökonomischer und herdengesundheitlicher Gesichtspunkte stark schwanken (DJORDJEVIC et al., 1997; THACKER et al., 1998; THACKER et al., 2000; SARRADELL et al., 2003).

Häufigste Anwendung findet eine One-Shot Impfung der Ferkel oder Läufer, abhängig vom Infektionszeitpunkt, der wiederum mit individuellen Faktoren der Produktionsstätten korrelieren kann (BACCARO et al., 2006; PIETERS & MAES, 2019). Maternale Antikörper beeinträchtigen die aktive Immunisierung von Saugferkeln kaum, wodurch auch sehr frühe Impfzeitpunkte möglich sind (MARTELLI et al., 2006). Ob Sauenimpfungen vor dem Abferkeln eine spätere Infektion der Saugferkel mit *M. hyopneumoniae* verhindern, wird kontrovers diskutiert, jedoch können diese zu weniger Lungenläsionen bei der Schlachttierkörperuntersuchung führen (RUIZ et al., 2003; SIBILA et al., 2008). Impfungen bei Jungsauen in endemisch infizierten Regionen, insbesondere während deren Eingliederung, können sich auf die Kontrolle und Eradikation von *M. hyopneumoniae* positiv auswirken (BARGEN, 2004).

Haltungsbedingungen und Herdenmanagement, wie Produktionsverfahren (Rein-Raus, Absetzzeitpunkt), Zukauf von (Zucht-) Tieren, Belegdichte, Herdengröße oder Stallklima, nehmen in der Prophylaxe eine Schlüsselrolle ein (MAES et al., 2008). Ein besonders kritischer Punkt hierbei ist die Aufnahme junger Sauen in die Zuchtherde (FANO et al., 2005; PIETERS & MAES, 2019). Unter Berücksichtigung einer ausgedehnten Infektionsdauer bei geringer Kontagiosität von *M. hyopneumoniae*, entwarfen PIETERS und FANO (2016) ein Modell zur Eingliederung, bei welchem sich Sauen vor dem ersten Abferkeln in kontrollierter und natürlicher Weise mit *M. hyopneumoniae* auseinandersetzen. Dadurch soll die Erregerausscheidung während dem Säugen auf ein Minimum reduziert werden können (PIETERS & FANO, 2016). Das Verhältnis zwischen Jung- und Altsauen, in Abhängigkeit der Expositionsdauer, ist für eine gesicherte und zeitnahe Auseinandersetzung der einzugliedernden Tiere mit *M. hyopneumoniae* hierbei zu beachten (ROOS et al., 2016).

Eine Erregerelimination kann ohne vollständige De- und Repopulation, neben Zuchtherden, auch in Mastbeständen gelingen (HEINONEN et al., 2011). Durch gezielten Einsatz von Antibiotika und Impfungen können Ferkel aus *M. hyopneumoniae* negativen Beständen in eine positive Herde integriert werden und der Mastbestand so auf lange Sicht in einen *M. hyopneumoniae* freien Bestand übergehen (HEINONEN et al., 2011). Eine Übersicht für Verfahren zur Bestandssanierung für Sauenbestände liefern HOLST et al. (2015), die ein besonderes Augenmerk auf Bestandschließungen, Vakzination und strategische antimikrobielle Therapie legen.



### III. MATERIAL UND METHODEN

#### 1. Untersuchungsmaterial

Das verwendete, bereits in Paraffin fixierte Lungengewebe, die Schlachtlungenscores und PCR-Ergebnisse wurden von der Klinik für Schweine der Justus-Liebig-Universität Gießen für diese Studie freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Sie stammten von Tieren aus einem deutschen Schweinebestand in Hessen mit rezidivierenden respiratorischen Symptomen und wurden im Zuge einer diagnostischen Aufarbeitung im Jahre 2018 erhoben. Der Bestand fiel durch wiederkehrenden Husten ab Mitte bis Ende der Mast bei Tieren ab etwa 80kg Körpermasse auf. Der Betrieb wurde in einem geschlossenen System im 3-Wochen-Rhythmus mit 180 Muttersauen, 750 Aufzucht- und 1500 Mastplätzen betrieben. Der Maststall selbst befand sich etwas abseits der restlichen Ställe. Die beprobten Tiere wurden sowohl am 7. Lebenstag gegen *M. hyopneumoniae* als auch am 27. Lebenstag gegen PCV2 intradermal als one-shot geimpft. Jungsauen wurden zugekauft und während der Quarantäne ebenfalls gegen *M. hyopneumoniae* geimpft und in die Zuchtherde integriert. Das Schneiden der Paraffinblöcke sowie das Färben der Schnitte mit Hämalaun-Eosin und die Durchführung der ISH fanden durch technisches Personal des Instituts für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München, ebenfalls 2018, statt. Erstellen und Anwenden adaptierter Scorings zur Datenerhebung aus den Gewebeschnitten und der ISH sowie das Zusammenführen, die statistische Auswertung und die Interpretation aller Daten wurde im Zuge der vorliegenden Arbeit durchgeführt. Hierbei war es von besonderem Interesse die durchgeführte ISH auf ihre diagnostische Aussagekraft hin zu untersuchen.

#### 2. Methoden I

Die hier beschriebenen Methoden wurden an der Justus-Liebig-Universität Giessen durchgeführt. Die Ergebnisse wurden uns übermittelt und für weitere wissenschaftliche Arbeiten überlassen.

### 2.1. Scoring der Lungenläsionen am Schlachthof

Am Schlachthof erfolgte eine makroskopische Beurteilung der Lungen im Zuge der Schlachttierkörperuntersuchung nach dem von MADEC und KOBISCH (1982) publizierten Schema. Hierzu wurde subjektiv semiquantitativ der prozentual veränderte Anteil an jedem der sieben Lungenlappen geschätzt und entsprechend Punkte vergeben, wie in Tabelle 3 dargestellt. Jeder der Lungenlappen konnte maximal 4 Punkte erreichen und eine gesamte Lunge höchstens 28 Punkte.

**Tabelle 3: Bewertungsschema für Lungenläsionen je Lappen nach MADEC und KOBISCH (1982)**

Score (Punkte)	Prozentual verändertes Lungengewebe
0	Keine makroskopischen Veränderungen
1	Weniger als 25%
2	26-50%
3	51-75%
4	Mehr als 75%

### 2.2. Entnahme Gewebeproben

Proben zur Durchführung der qPCR sowie pathohistologischer Untersuchungen wurden aus makroskopisch besonders veränderten Bereichen während der Schlachttierkörperuntersuchung entnommen. Dies waren meist Spitzenlappenareale, seltener aus den Mittellappen. Nach Rückstellung eines Anteils zur späteren Durchführung der qPCR wurde das Gewebe in 10% Formalin 24 Stunden fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet.

### 2.3. Durchführung der qPCR

Die molekularbiologische Diagnostik wurde basierend auf der von STRAIT et al. (2008) veröffentlichten Technik durchgeführt. Von zwei Primern (MHP183F und MHP183R) und einer Sonde (MHP183P) wurden je 5µl gemeinsam mit 12,5µl Mastermix ABsolute Blue QPCR Rox (Thermo Fisher Scientific, Großbritannien), 8,5µl H<sub>2</sub>O und 2,5µl extrahierter DNA zu insgesamt 25µl Reaktionsvolumen zusammenpipetiert. Anschließend

führte ein 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Deutschland) die qPCR durch. Mit folgendem Zyklus wurde der Thermocycler betrieben: Aktivierung der DNA-Polymerase bei 95°C für 15 Minuten, anschließend 40 Zyklen bestehend jeweils aus Denaturierung bei 95°C für 15 Sekunden und Anlagerung und Elongation der Primer bei 60°C für 60 Sekunden.

### **3. Methoden II**

In diesem Kapitel werden ausschließlich Methoden beschrieben, welche an der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt wurden. Hierfür verwendete Gerätschaften und Lösungen sind im Anhang ab Seite 97 entsprechend ihres Verweises (z.B. IX.3.) aufgeführt. Verbrauchsmaterialien werden direkt mit Herstellerangaben genannt.

#### **3.1. Schneiden der Paraffinblöcke**

Zur Weiterverarbeitung wurden die überstellten Paraffinblöcke zunächst auf einer Kühlplatte<sup>1</sup> (XI.2) auf -20°C herabgekühlt. Anschließend wurden mithilfe eines Rotationsmicrotoms<sup>2</sup> (XI.2) Schnitte in der Dicke von 2-3µm angefertigt und in einem Streckbad<sup>3</sup> (XI.2) gestreckt. Danach wurden die Schnitte auf beschichtete Objektträger (Starfrost, Engelbrecht GmbH, Edermünde, Nr. 11250) aufgezogen und im Trockenschrank<sup>4</sup> (XI.2) bei 38°C über Nacht gelagert. Von jedem Paraffinblock wurden nach oben genannter Vorgehensweise je zwei Objektträger bestückt und nach entsprechenden Protokollen mit Hämalaun-Eosin (III.3.2) gefärbt oder in einer In-situ-Hybridisierung (III.3.3) weiter bearbeitet.

#### **3.2. Protokoll zur Durchführung der Hämalaun-Eosin (HE) Färbung**

Die Schnitte wurden vorab entparaffiniert. Hierzu wurden sie 20 Minuten in Xylol 98%ig (SAV Liquid Production, Flintsbach am Inn, Nr. XTR-5000-91-1) gestellt. Anschließend wurden sie jeweils 10-mal in eine absteigende Alkoholreihe, wie folgt, und abschließend in Aqua dest. getaucht: 2-mal 100%ig (SAV Liquid Production, Flintsbach am Inn, Nr. ETO-300000-99-1), 2-mal 96%ig (SAV Liquid Production, Flintsbach am Inn, Nr. ETO-300000-96-1), 1-mal 70%ig (XI.3.1).



### Die Schnitte nun

- in Mayer's Hämalun (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09249) stellen, 4 Minuten
- warm wässern, 4 Minuten
- bei Überfärbung in 0,5%iger HCl-Ethanol Lösung (XI.3.3) durch 2-maliges Eintauchen differenzieren
- warm wässern, 4 Minuten
- in 1%ige Eosin Lösung (XI.3.4) einstellen, 3 Minuten
- 2-mal in Aqua dest., jeweils 10-mal in eine aufsteigende Alkoholreihe wie folgt: 1-mal 70%ig, 2-mal 96%ig und 2-mal 100%ig und abschließend 5-mal in Xylol 98%ig tauchen
- mit Histokit (Hecht-Assistent, Sondheim, Nr. 41025010) eindecken
- 24 Stunden an der Luft bei Raumtemperatur trocknen lassen.

### 3.3. Protokoll zur Durchführung der In-situ-Hybridisierung

Bei dem hier beschriebenen Protokoll handelt es sich um ein Standardprotokoll zur Durchführung einer ISH wie es an dem Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München angewendet wird. Die verwendete Sonde (5'-CCGTCAAGACTAGAGCAT-3') kam bereits bei einer ISH zum Einsatz und wurde als hochspezifisch und sensitiv für die 16s rRNA von *M. hyopneumoniae* beurteilt (BOYE et al., 2001). Im Gegensatz zu BOYE et al. (2001) wurde in der vorliegenden Untersuchung eine Kopplung der Sonde mit Digoxigenin und daran gebundener enzymatisch induzierter Farbreaktion gewählt, da dieses als praktikableres Verfahren im Gegensatz zu fluoreszierenden Sonden betrachtet wurde. Dadurch wurde die Auswertung der Proben mithilfe eines gewöhnlichen Lichtmikroskopes möglich.

Vor Beginn der In-situ-Hybridisierung wurden die Schnitte, wie in Kapitel III.3.2 beschrieben, entparaffiniert.

## Anschließend die Schnitte

- in eine 1%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Gebrauchslösung (XI.3.27) für 15 Minuten einstellen und im Anschluss kurz wässern und je 5-mal in Aqua dest. und Aqua bidest eintauchen
- in 1%ige Target Retrieval Solution (XI.3.28) einstellen und 2-mal 10 Minuten in einer Mikrowelle<sup>12</sup> bei 800 Watt erhitzen. Vor Weiterbehandlung 10 Minuten abkühlen lassen
- 2-mal kurz in Aqua dest., 1-mal kurz in Ethanol 96%ig tauchen und für 5 Minuten in reinen Alkohol (AppliChem, Darmstadt, Nr. A3678) stellen
- an der Luft trocknen
- mit Gebrauchslösung aus Hybridisierungslösung 1 und 2 (XI.3.10) vollständig bedecken und bei 98°C im Wasserbad<sup>6</sup> kochen, 6 Minuten
- auf Eis-Ethanol Gemisch (XI.3.18) schockkühlen, 3 Minuten
- in einer feuchten Kammer über Nacht bei 45°C im Trockenschrank<sup>4</sup> inkubieren
- bei 40°C im Trockenschrank<sup>4</sup> in (4x) SSC Verdünnungsstufe (XI.3.29) 5 Minuten vorbehandeln und danach die Proben weitere 5 Minuten bei Raumtemperatur in einer (4x) SSC Gebrauchslösung einstellen
- in (2x, 1x und 0,1x) SSC Verdünnungsstufen (XI.3.19) waschen, jeweils 10 Minuten
- vollständig mit Äquilibrierungspuffer (XI.3.20) bedecken und in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur verweilen lassen, 30 Minuten
- kippen und den Äquilibrierungspuffer abschütten
- vollständig mit Antikörper Gebrauchslösung (XI.3.22) bedecken und bei Raumtemperatur in die feuchte Kammer stellen, 60 Minuten

- in (1x) Puffer I (XI.3.21) 2-mal spülen, jeweils 15 Minuten.
- in Puffer III (XI.3.23) einstellen, mindestens 10 Minuten
- vollständig mit Gebrauchslösung Farbreaktion (XI.3.24) bedecken und im Dunkeln und erschütterungsfrei inkubieren lassen, 1 Stunde
- kippen und die Farbreagenz abschütten
- in (1x) TE-Puffer (XI.3.16) einstellen, 10 Minuten
- mit Aqua dest. abspülen
- nach Bedarf mit verdünntem Hämalun (XI.3.26) gegenfärben
- wässern, 10 Minuten
- mit Aqua dest. abspülen
- eindecken mit Aquatex (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nr. 108562).

### **3.4. Beurteilung der histologischen Schnitte**

Gescort wurde im semiquantitativen Verfahren. Hierbei wurde ein Lichtmikroskop (Leica, Wetzlar, Model DM2500) verwendet.

#### **3.4.1. Scoring der HE-Proben**

Zum Bewerten der Ausprägung *M. hyopneumoniae*-typischer Läsionen in den histologischen Schnitten, wurde ein System, in Anlehnung an das von OPRIESSNIG et al. (2004) beschriebene, verwendet. Unter dem Beurteilungspunkt „Verdickung der Alveolarsepten“ wurden sowohl die Pneumozyten Typ II Hyperplasie als auch die Verdickung der Alveolarsepten infolge von Entzündungszellinfiltration zusammengefasst (siehe Tabelle 5). Die Läsionen wurden in ihrer Gesamterscheinung, bezogen auf den histologisch jeweils dargestellten Anschnitt, beurteilt. Je nach Schweregrad und Verteilungsmuster wurden Punkte von 0 bis 6 vergeben (Tabelle 4).

**Tabelle 4: Auflistung der Grade/Punkte mit dazugehörigem Schweregrad und Verteilungsmuster wie sie im Zuge des HE-Scorings zur Beurteilung der histologischen Veränderungen angewendet wurden**

Grad/Punkte	Schweregrad und Verteilungsmuster
0	Physiologisch
1	Geringgradig multifokal
2	Geringgradig diffus
3	Mittelgradig multifokal
4	Mittelgradig diffus
5	Hochgradig multifokal
6	Hochgradig diffus

Eine diffuse Ausdehnung bedeutete hierbei, dass der gesamte untersuchte Lungenanschnitt von der entzündlichen Veränderung betroffen war. Multifokal wurde gewählt, wenn mehrere Entzündungsherde vorlagen. Um die unterschiedlichen BALT-Anbildungsgrade besser erfassen zu können wurde hier die Bewertung angepasst: 1 und 2 Punkte für multifokale und diffuse BALT-Hyperplasie mit je einer Follikelorganisation an betroffenen Bronchien/ Bronchiolen; 3 und 4 Punkte für multifokale und diffuse BALT-Hyperplasie mit je 1-2 Follikelorganisationen an betroffenen Bronchien/ Bronchiolen; 5 und 6 Punkte für multifokale und diffuse BALT-Hyperplasie mit mehr als 2 Follikelorganisationen an betroffenen Bronchien/ Bronchiolen.

**Tabelle 5: Berücksichtigte EP-typische Läsionen bei der Beurteilung der HE-gefärbten Lungengewebeschnitte**

Verdickung der Alveolarsepten	BALT-Hyperplasie	Exsudat in Alveolen	Peribronchiale, peribronchioläre Infiltration mit Entzündungszellen
-------------------------------	------------------	---------------------	---

### 3.4.2. Scoring der ISH-Proben

Zur übersichtlichen Erfassung der Lokalisation und Stärke einzelner Signale der ISH wurden die von KWON und CHAE (1999) als Prädisloktionsstellen bekannten Strukturen in tabellarischer Form zusammengestellt. Ergänzt wurde diese Methode durch eine semiquantitative Schätzung der Gesamtmenge an positiven Signalen und Lokalisationen. Zunächst wurde jede Lokalisation einzeln bewertet und anschließend die Gesamtsignalmenge festgehalten. Folgendes Bewertungsschema fand hierbei Anwendung: -: negativ, keine positiven Signale; +: geringgradig, schwaches Signal an wenigstens einer Lokalisation; ++: mittelgradig, schwache bis mäßig starke Signale an wenigen Lokalisationen; +++: hochgradig, starke Signale an mehreren Lokalisationen. Zusätzlich wurde im Zuge der Auswertung noch ein addierter Summenscore der ISH gebildet, wobei die den Graden entsprechenden Werte aller 5 Lokalisationen einer Probe addiert wurden (0 bis 15 Punkte).

**Tabelle 6: Prädisloktionsstellen für ISH-Signale beim intraläsionalen Erregernachweis von *M. hyopneumoniae* nach KWON und CHAE (1999)**

Entzündungszellen im Interstitium	Bronchial-epithel	Bronchiolus-epithel	Alveolar-makrophagen	Pneumozyten
-----------------------------------	-------------------	---------------------	----------------------	-------------

## 4. Statistik

Die Zusammenführung und Erfassung aller Daten sowie die Diagrammerstellung wurde mithilfe des Tabellenkalkulationsprogrammes Excel® 2016 (Microsoft Office, Fa. Microsoft, Redmond, USA) durchgeführt. Die statistische Auswertung und Erstellung der Boxplots

erfolgte mit der Statistiksoftware IBM SPSS® Statistics Version 26 (Fa. IBM Corp., Armonk, USA).

Im Zuge der deskriptiven Statistik wurden für alle quantitativen Datensätze folgende Parameter erhoben: das arithmetische Mittel (Mittelwert), der Median, die Standardabweichung sowie Minimum und Maximum. Die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung erfolgte im Anschluss mittels des Kolmogorov-Smirnov-Tests. Auf Basis dessen konnten daraufhin die geeigneten Tests zur weiteren Auswertung ausgewählt werden.

Der Mann-Whitney-U-Test diente zur Berechnung signifikanter Unterschiede der seitenvergleichenden Analyse der Verteilung der Läsionen auf die Lungenlappen.

Die Ergebnisse der makroskopischen und histologischen Untersuchung sowie die Ergebnisse der Auswertung der ISH und die in den Lungengewebeproben mittels qPCR ermittelten Erregerlasten wurden untereinander statistisch auf Korrelationen hin untersucht. Hierfür wurde der Rangkorrelationskoeffizient Spearmans Rho verwendet.

Zusätzlich wurden die Daten aller 27 Lungenproben nach den Ergebnissen des Gesamtscores der ISH in die Gruppen positiv und negativ sowie in vier Grade (negativ, geringgradig, mittelgradig und hochgradig) aufgeteilt, um vorhandene signifikante Unterschiede darzustellen. Nach demselben Muster wurden alle Daten auch in Gruppen, basierend auf den Daten der Unterkategorien des ISH-Scorings „Bronchialepithel“ und „Bronchiolusepithel“, eingeteilt. Hierfür wurde der Mann-Whitney-U-Test und bei mehr als zwei Gruppen der Kruskal-Wallis-Test angewendet. Im Zuge der paarweisen Analyse wurde das Signifikanzniveau post-hoc mit der Bonferroni-Korrektur angepasst.

Als Grundlage der Sensitivitätsberechnung der ISH diente folgende Formel ( $n$ =Anzahl):

$$\text{Sensitivität (\%)} = \frac{\text{richtig positive (n)}}{(\text{richtig positive (n)} + \text{falsch negative (n)})} \times 100$$

Als richtig positiv sind die Gesamtheit aller 27 verwendeten Proben und damit alle Proben mit positiven Ergebnissen in der qPCR zu betrachten.

Falsch negativ sind jene Proben, die zwar positive qPCR Ergebnisse aufwiesen, jedoch keine Signale in der ISH zeigten.

Zur Berechnung des positiven Vorhersagewertes (positive predictive value, PPV) wurde folgende Formel verwendet:

$$PPV (\%) = \frac{\textit{richtig positive (n)}}{(\textit{richtig positive (n)} + \textit{falsch positive (n)})} \times 100$$

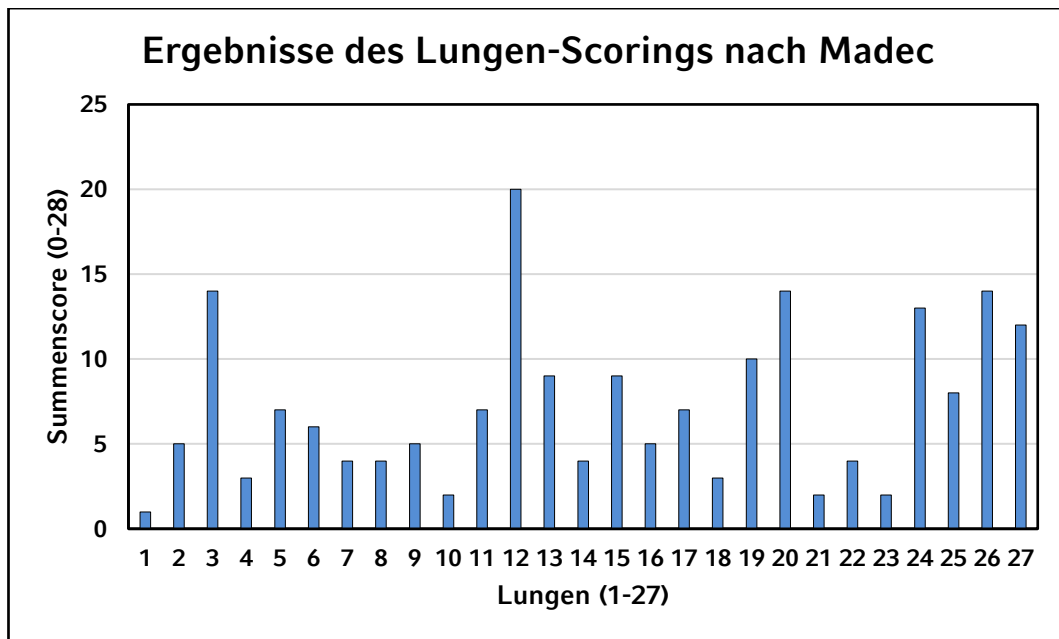
## IV. ERGEBNISSE

Im Vorfeld dieser Arbeit wurde Lungengewebe von Tieren im Rahmen der Schlachttierkörperuntersuchung gewonnen. Von insgesamt 67 am Schlachtband genommenen Lungengewebeproben wurden 27 mittels qPCR positiv auf *M. hyopneumoniae* spezifische Genomfragmente getestet. Die positiven Proben und dazugehörige Befundergebnisse wurden für weitere Untersuchungen verwendet, wohingegen die übrigen 40 Proben von der vorliegenden Studie ausgeschlossen wurden. Im Folgenden werden die in den Scorings vergebenen Punkte synonym mit den Graden der Läsionen verwendet. Eine Übersicht aller erhobenen Daten sind in tabellarischer Form ab Seite 97 einsehbar.

### 1. Beurteilung von Lungenläsionen am Schlachthof

Die Lungen aller 27 Tiere wiesen EP-typische Läsionen bei der Beurteilung im Zuge der Schlachttierkörperuntersuchung auf. Im Mittel lag der Lungenscore nach Madec zwischen  $7,19 \pm 4,75$  Punkten, wobei mindestens eine Gesamtsumme von 1 und maximal 20 Punkten erreicht wurde (Abbildung 1).





**Abbildung 1: Ergebnisse des Lungen-Scorings nach MADEC und KOBISCH (1982) für die 27 Lungengewebebeurteilungen mit dazugehörigem Summenscore (1-28 Punkte)**

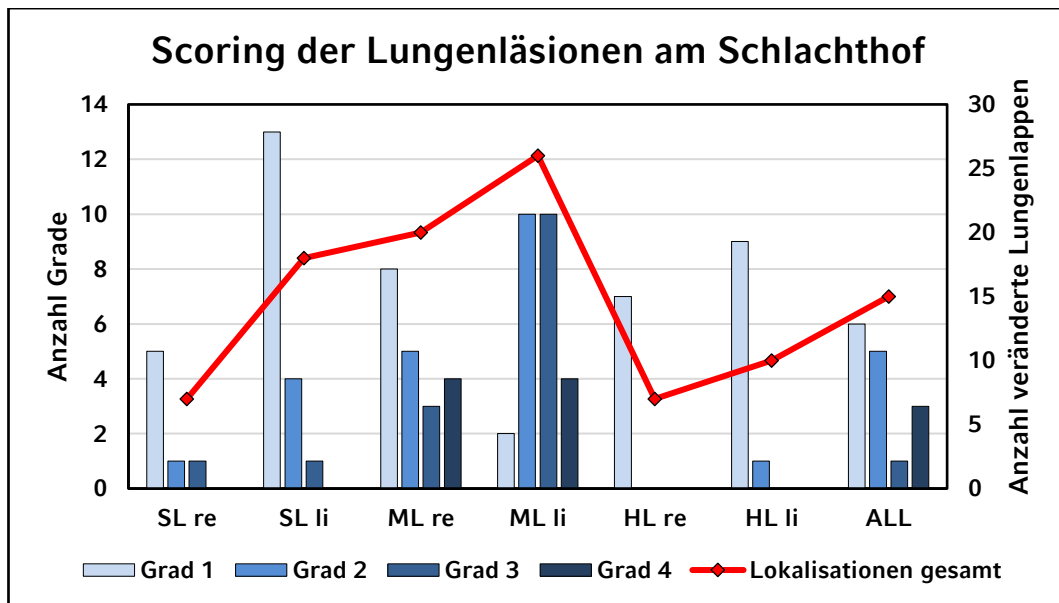
### 1.1. Verteilung der Läsionen innerhalb der Lungen

Am häufigsten wurden in den beiden mittleren (46/54, 85,2%) und dem akzessorischen Lungenlappen (15/27, 55,6%) makroskopische Läsionen registriert. Die kranialen Spitzenlappen waren zu 46,3% (25/54) und die kaudal gelegenen Hauptlappen zu 31,5% (17/54) betroffen. In der seitenvergleichenden Betrachtung der paarig angelegten Lungenlappen wiesen die linken Spitzenlappen bei 18 Lungen und auf der rechten Seite bei 7 Lungen makroskopische Veränderungen auf, wobei sich dieser Unterschied als signifikant darstellte ( $p = 0,005$ ). Die linken Mittellappen waren bei 26 Lungen makroskopisch verändert und die rechten Mittellappen bei 20 Lungen. Der Unterschied erwies sich als signifikant ( $p = 0,007$ ). Hinsichtlich der Anzahl veränderter Lungenlappen ergab der Seitenvergleich der kaudalen Hauptlappen keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,346$ ): Auf der linken Seite wurden auf diesem Lappen bei 10 Lungen makroskopische Läsionen gefunden und auf der rechten Seite bei 7 Lungen. Teilt man die Lunge nach anatomischen Richtlinien der Seitenzugehörigkeit auf, so wird zur rechten Lungenseite noch der akzessorische Lungenlappen gezählt (KÖNIG & LIEBICH, 2018). Die rechte Lunge wies demnach im Mittel  $1,81 \pm 1,33$  veränderte Lungenlappen auf, was in Summe 49 veränderten Lungenlappen auf der rechten Lungenhälfte

entsprach. Die linke Lunge zeigte durchschnittlich an  $2 \pm 0,78$  Lungenlappen makroskopische Läsionen und in Summe 54. Dieser Unterschied stellte sich jedoch als nicht signifikant dar ( $p= 0,699$ ). Eine Übersicht über die Anzahl veränderter Lungenlappen bietet Abbildung 2.

### **1.2. Verteilung der Schweregrade innerhalb der Lungen**

Insgesamt wurden 103 veränderte Lungenlappen erfasst, wovon 50 (48,6%) mit 1 Punkt, 26 (25,3%) mit 2 Punkten, 16 (15,6%) mit 3 Punkten und 11 (10,7%) mit 4 Punkten beurteilt wurden. Durchschnittlich wiesen die Mittellappen die schwersten Läsionsgrade mit  $2,06 \pm 1,28$  Punkten auf, gefolgt von dem akzessorischen Lungenlappen ( $1,15 \pm 1,35$ ), den Spitzenlappen ( $0,63 \pm 0,81$ ) und den Hauptlappen ( $0,33 \pm 0,51$ ). Der Seitenvergleich paarig angelegter Lungenlappen zeigte, dass die linken Spitzenlappen ( $p= 0,003$ ) und Mittellappen ( $p= 0,023$ ) signifikant schwerere Läsionsgrade aufwiesen als die der rechten Seite. Der Seitenvergleich der kaudalen Hauptlappen ergab keinen signifikanten Unterschied ( $p= 0,384$ ). Die gesamte Lunge geteilt betrachtet ergab für alle rechten Lungenlappen im Mittel einen Score von  $3,37 \pm 3,15$  und für alle linken Lungenlappen von  $3,81 \pm 1,88$  Punkten. Dieser Seitenunterschied erwies sich als nicht signifikant ( $p= 0,199$ ). Eine Übersicht über die Verteilung der Grade innerhalb der Lungenlappen bietet Abbildung 2.

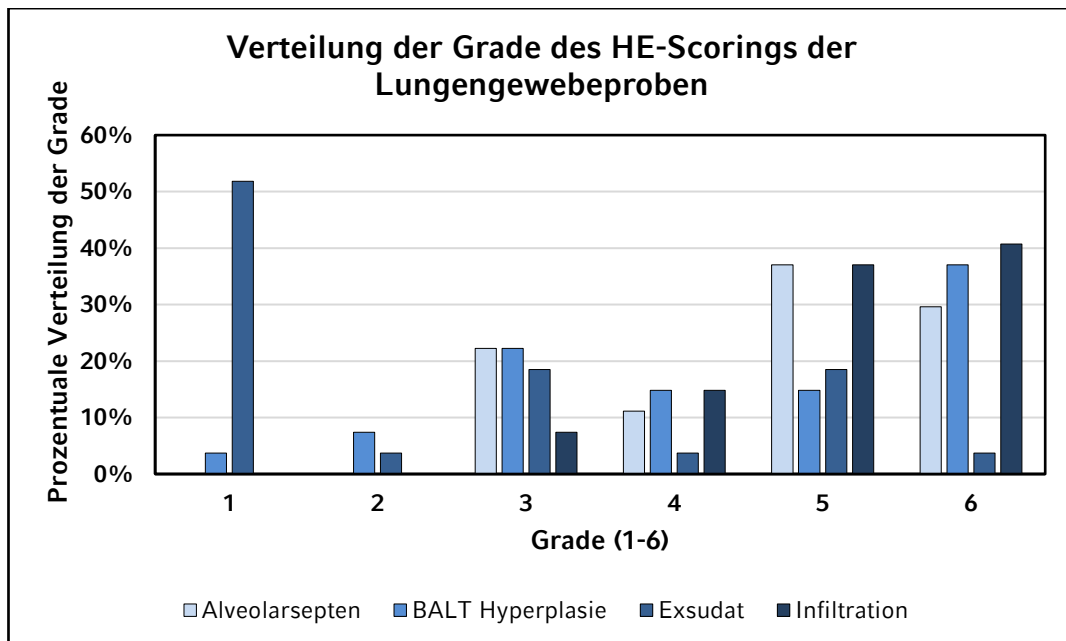


**Abbildung 2:** Die Ergebnisse des Scorings der Lungenläsionen im Zuge der Schlachttierkörperuntersuchung aufgeteilt nach Lungenlappen und Grad der Läsionen zusammen mit der Anzahl der Grade und der Anzahl veränderter Lungenlappen (SL= Spitzenlappen, ML= Mittellappen, HL= Hauptlappen, ALL= akzessorischer Lungenlappen, re= rechts, li= links)

## 2. Histologisches Scoring

### 2.1. Scoring der Hämalaun-Eosin gefärbten Schnitte

Alle 27 Lungenproben zeigten entzündliche Alterationen, wobei die Ausprägungsgrade variierten (Abbildung 3). Im Durchschnitt wurde ein Summenscore aller addierten Grade der vier untersuchten Parameter von  $16,70 \pm 3,58$  Punkten erreicht, wobei das Maximum bei 23/24 Punkten und das Minimum bei 9/24 Punkten lag.



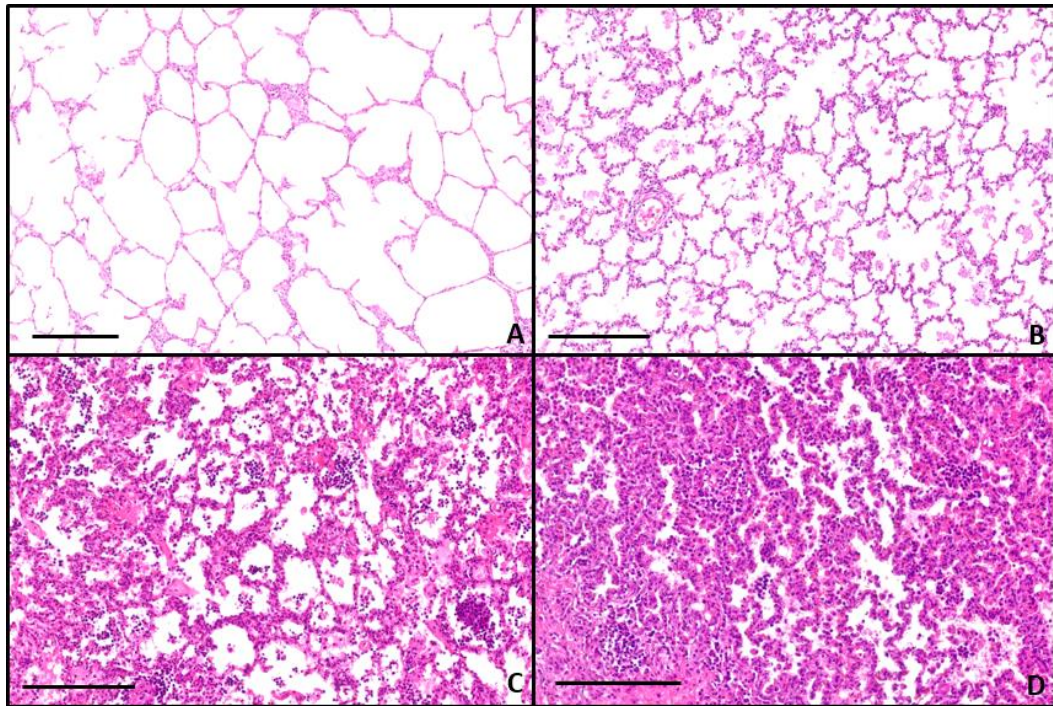
**Abbildung 3: Verteilung Grade (1-6) der im HE-Scoring untersuchten histologischen Veränderungen der 27 Lungengewebebeobachten**

### 2.1.1. Verdickung der Alveolarsepten

Eine pathologische Verdickung der Alveolarsepten trat bei allen Lungengewebebeobachten auf. Durchschnittlich wurde diese Läsion mit  $4,74 \pm 1,13$  Punkten beurteilt (Tabelle 7). Keine der Lungen wurde als geringgradig (1-2 Punkte) verändert eingestuft. Mittelgradig (3-4 Punkte) verändert waren 9 (33,3%) Lungen, wovon 6 (22,2%) ein multifokales (3 Punkte) und 3 (11,1%) ein diffuses (4 Punkte) Verteilungsmuster zeigten. Die meisten Lungen (18/27, 66,7%) waren hochgradig (5-6 Punkte) verändert, wobei 10 (37,0%) multifokal hochgradige (5 Punkte) und 8 (29,6%) diffuse hochgradige (6 Punkte) Verdickungen der Alveolarsepten aufwiesen. Eine Übersicht der einzelnen Grade bietet Abbildung 4.

**Tabelle 7: Anzahl Lungen mit Verdickung der Alveolarsepten nach Graden sortiert und mittlerer Grad mit Standardabweichung aller untersuchten Lungen**

Grad (Punkte)	1	2	3	4	5	6	Mittlerer Grad aller Lungen
Anzahl Lungen	0	0	6	3	10	8	$4,75 \pm 1,13$



**Abbildung 4:** Beispielhafte Darstellung der Verdickung der Alveolarsepten von unauffällig (A), geringgradig (B), mittelgradig (C) bis hochgradig (D). Skala entspricht 200µm, Hämalaun-Eosin, Quelle: Eigene Aufnahme

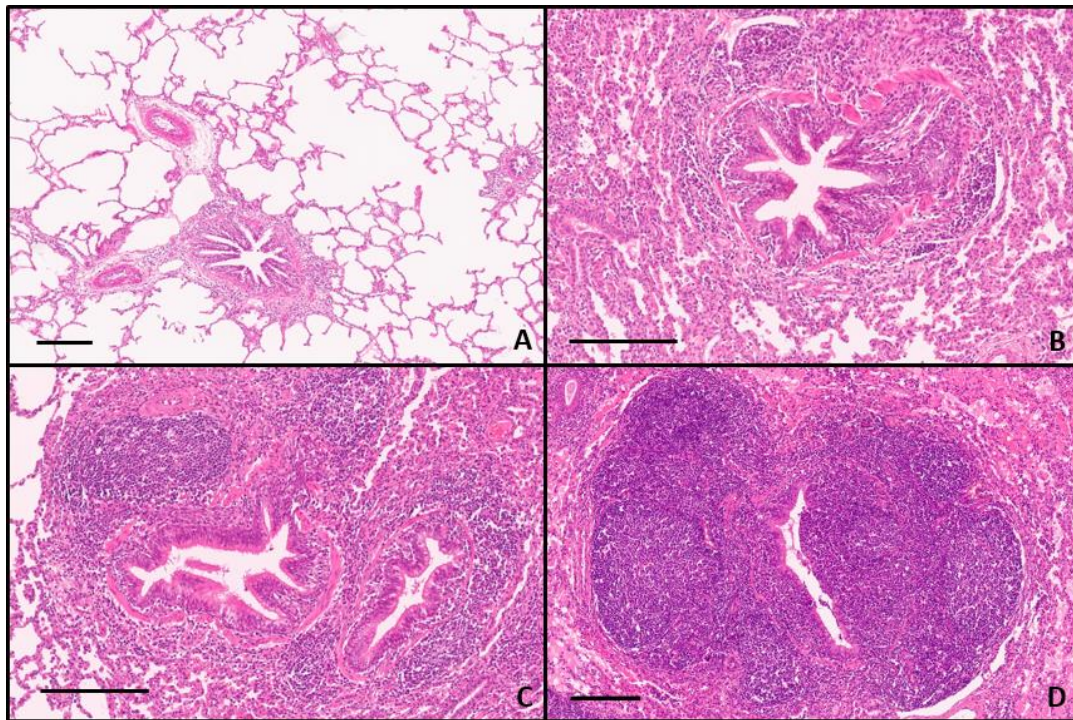
### 2.1.2. Ausprägung der Hyperplasie des Bronchus-assoziierten lymphatischen Gewebes

Durchschnittlich wurde die BALT-Hyperplasie aller 27 untersuchten Lungengewebeproben mit  $4,41 \pm 1,55$  Punkten bewertet, wobei keine Lunge ohne BALT-Hyperplasie beobachtet wurde (Tabelle 8). Schwache Anbildungsstadien mit nur einem Follikel (1-2 Punkte) nahmen den geringsten (3/27, 11,1%) Anteil hierbei ein. So zeigte ein Tier (3,7%) multifokale (1 Punkt) und 2 Tiere (7,4%) diffuse (2 Punkte) BALT-Hyperplasie mit einem Follikel. 10 Tiere (37,04%) wiesen Stadien mit 1-2 Follikeln auf, wobei sich 6 Tiere (22,2%) mit multifokalem (3 Punkte) und 4 Tiere (14,8%), mit diffusem (4 Punkte) Verteilungsmuster präsentierten. 14 Tiere (51,6%) und damit über die Hälfte aller Proben, hatte lymphatische Hyperplasien mit mehr als 2 Follikeln. Darunter waren 4 Tiere (14,8%) mit multifokaler (5 Punkte) und 10 Tiere (37,0%) mit diffuser (6 Punkte) Ausbreitung. Die verschiedenen Grade der BALT Ausprägung sind in Abbildung 5 gezeigt.



**Tabelle 8: Anzahl Lungen mit Bronchus-assoziiierter lymphatischer Hyperplasie nach Grad sortiert und mittlerer Grad mit Standardabweichung aller untersuchten Lungen**

Grad (Punkte)	1	2	3	4	5	6	Mittlerer Grad aller Lungen
Anzahl Lungen	1	2	6	4	4	10	4,41 ± 1,55



**Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung der BALT-(bronchus-associated lymphoid tissue) Ausprägungsgrade von unauffällig (A), geringgradig (B), mittelgradig (C) bis hochgradig (D). Skala entspricht 200µm, Hämalaun-Eosin, Quelle: Eigene Aufnahme**

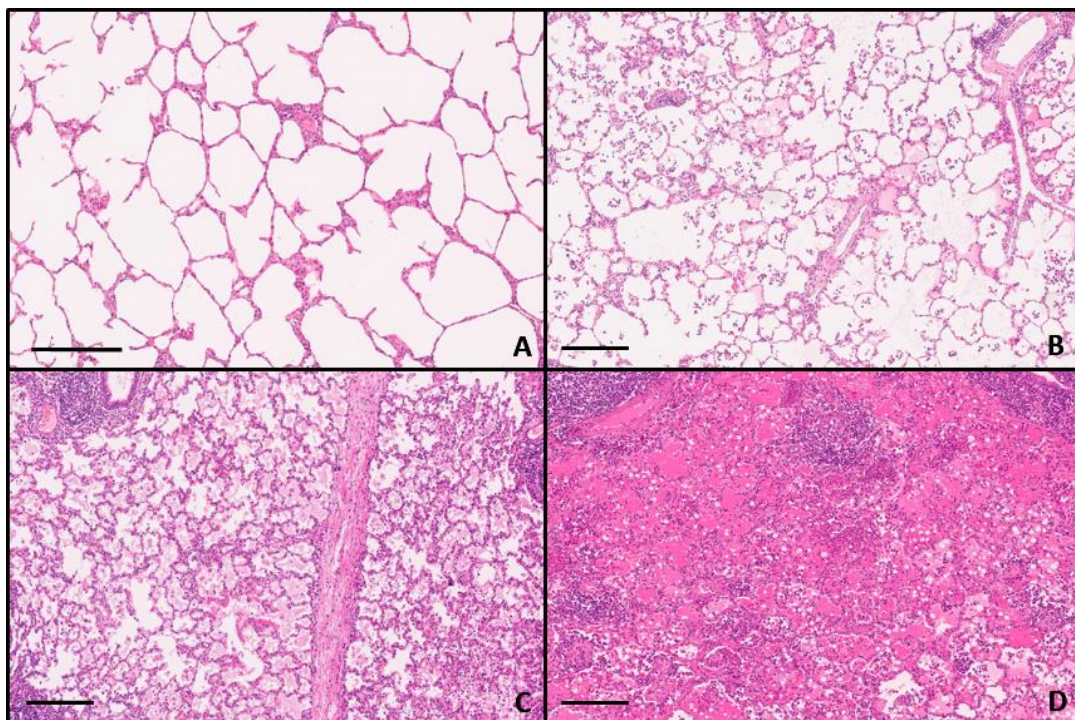
### 2.1.3. Exsudat in den Alveolen

Die durchschnittliche Ausprägung von Exsudat in den Alveolen (Abbildung 6) war von allen vier untersuchten Läsionen am geringsten ( $2,44 \pm 1,74$  Punkte), wobei alle Tiere einen Grad zwischen 1-6 dieser Läsion aufwiesen (Tabelle 9). In 14 Fällen (51,8%), und somit mehrheitlich, wurde Exsudat in den Alveolen mit einer geringgradig multifokalen (1 Punkt) Ausprägung beobachtet. Eines der Tiere (3,7%) zeigte diese Ausprägung mit einem diffusen Verteilungsmuster (2 Punkte). In Summe traten geringgradige Mengen an Exsudat bei 15 Tieren (55,6%) auf. Gleichmaßen verteilt traten mittelgradige und hochgradige Mengen bei je 6 Tieren (22,2%) auf. Mittelgradige Mengen an Exsudat fanden sich bei 5 Tieren (18,5%) an

multifokalen Stellen (3 Punkte) und bei einem Tier (3,7%) diffus (4 Punkte) verteilt. Hochgradig multifokal (5 Punkte) zeigten sich 5 Tiere (18,5%) und wiederum eines (3,7%) mit diffus (6 Punkte) Verteilungsmuster.

**Tabelle 9: Anzahl Lungen mit Exsudat in den Alveolen nach Grad sortiert und mittlerer Grad mit Standardabweichung aller untersuchten Lungen**

Grad (Punkte)	1	2	3	4	5	6	Mittlerer Grad aller Lungen
Anzahl Lungen	14	1	5	1	5	1	2,44 ± 1,74



**Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Füllung der Alveolen mit Exsudat und Ödemflüssigkeit von unauffällig (A), geringgradig (B), mittelgradig (C) bis hochgradig (D). Skala entspricht 200µm, Hämalaun-Eosin, Quelle: Eigene Aufnahme**

#### **2.1.4. Peribronchiale und peribronchioläre Infiltration mit Entzündungszellen**

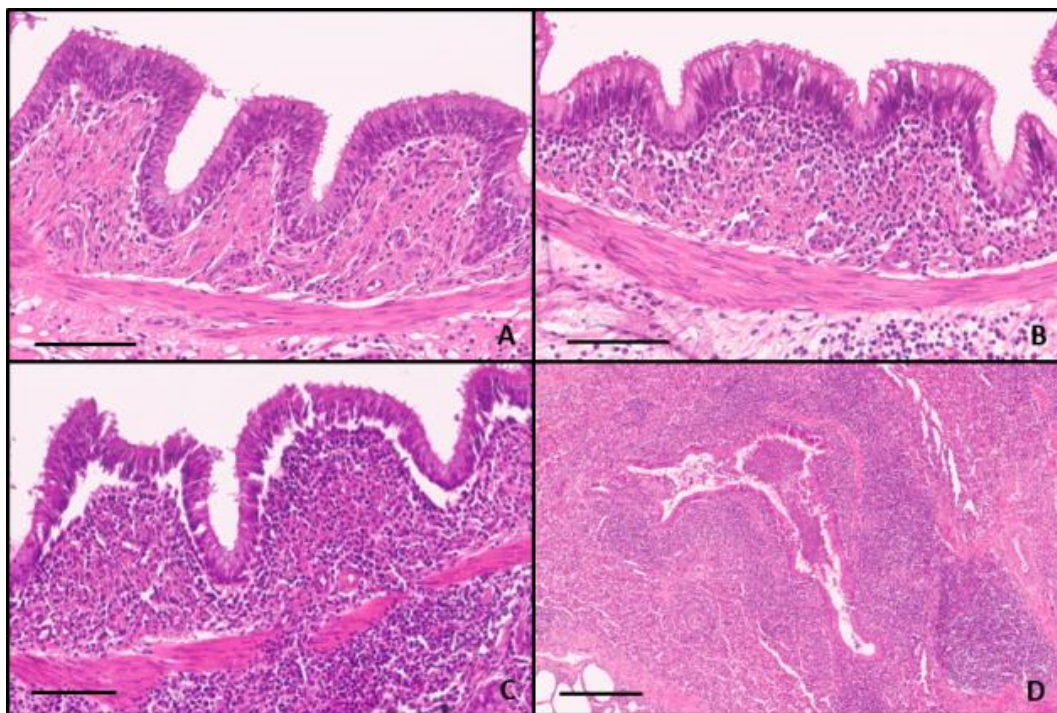
Jede untersuchte Lunge zeigte entzündliche Infiltrate um die luftführenden Strukturen (Abbildung 7). Im Mittel erreichten die Proben einen Score von  $5,11 \pm 0,93$  Punkten (Tabelle 10). Keine der Lungen zeigte hierbei geringgradige (1-2 Punkte) Infiltrationen. Mittelgradige Stadien wurden bei 6 Tieren (22,2%) beobachtet, wovon 2 (7,4%) multifokal (3 Punkte) und 4 (14,8%) diffus (4 Punkte) auftraten. Den zahlenmäßig größten Anteil



stellten hochgradige Veränderungen dar (21/27 Tiere, 77,8%). Diese traten bei 10 Tieren (37,0%) multifokal (5 Punkte) und bei 11 Tieren (40,7%) diffus (6 Punkte) auf.

**Tabelle 10: Anzahl Lungen mit peribronchialer und peribronchiolärer Infiltration mit Entzündungszellen nach Graden sortiert und mittlerer Grad mit Standardabweichung aller untersuchten Lungen**

Grad (Punkte)	1	2	3	4	5	6	Mittlerer Grad aller Lungen
Anzahl Lungen	0	0	2	4	10	11	5,11 ± 0,93



**Abbildung 7: A bis C: Beispielhafte Darstellung der Zelleninfiltration der Lamina propria eines Bronchus von geringgradig (A), mittelgradig (B) bis hochgradig (C). Skala entspricht 100µm, Hämalaun-Eosin. D: Übersichtsaufnahme einer hochgradigen Entzündungszelleninfiltration der Lamina propria eines Bronchiolus mit angebildetem BALT. Skala entspricht 300µm, Hämalaun-Eosin. Quelle: Eigene Aufnahme**

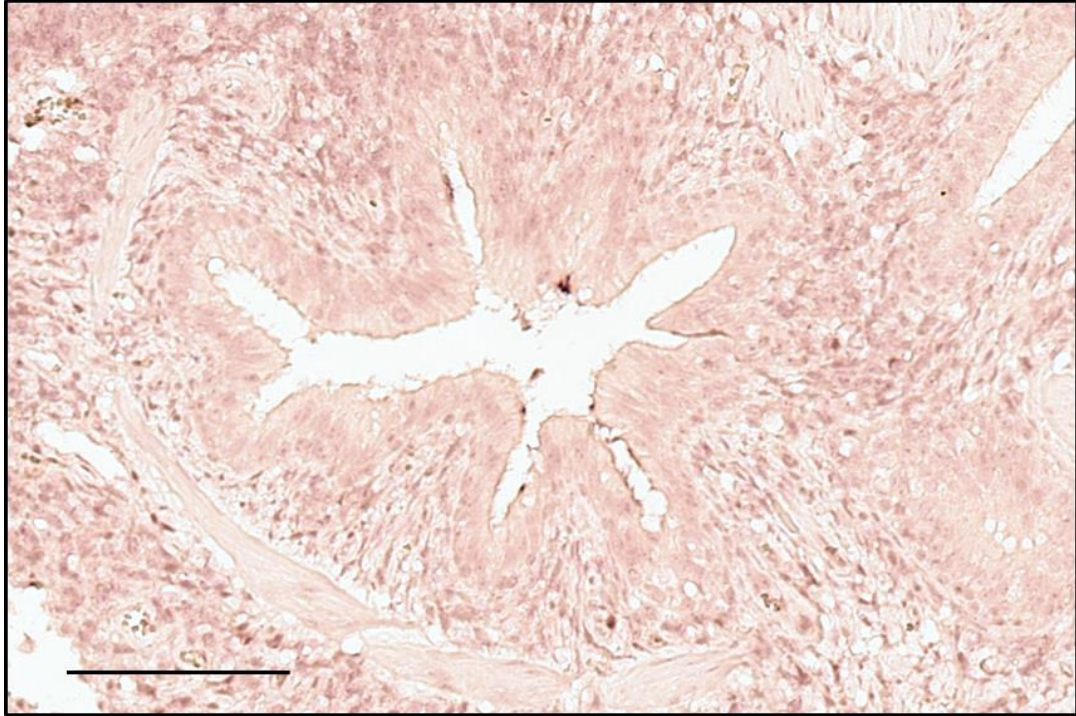
## 2.2. Scoring der In-situ-Hybridisierung

Um die erhobenen Daten besser vergleichen zu können, wurden im Folgenden die Grade – (negativ), + (geringgradig, Abbildung 8), ++ (mittelgradig, Abbildung 9) und +++ (hochgradig, Abbildung 10) mit den entsprechenden Zahlen 0, 1, 2 und 3 gleichgesetzt.

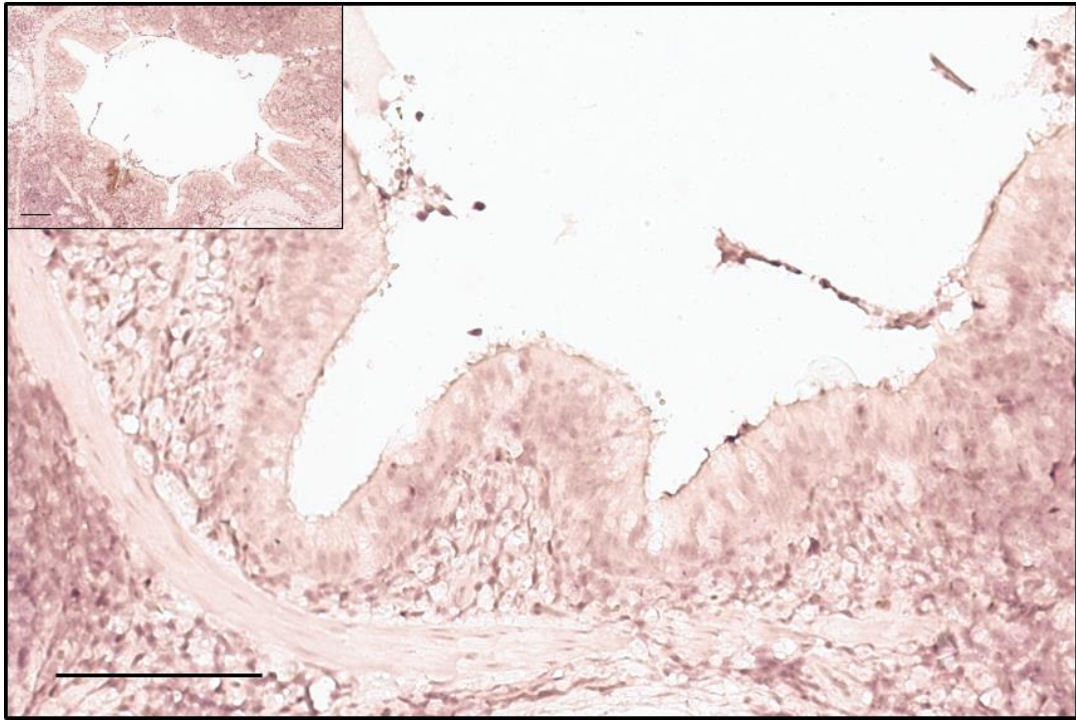
Bei 21 der 27 (77,8%) untersuchten Proben konnten ISH-Signale



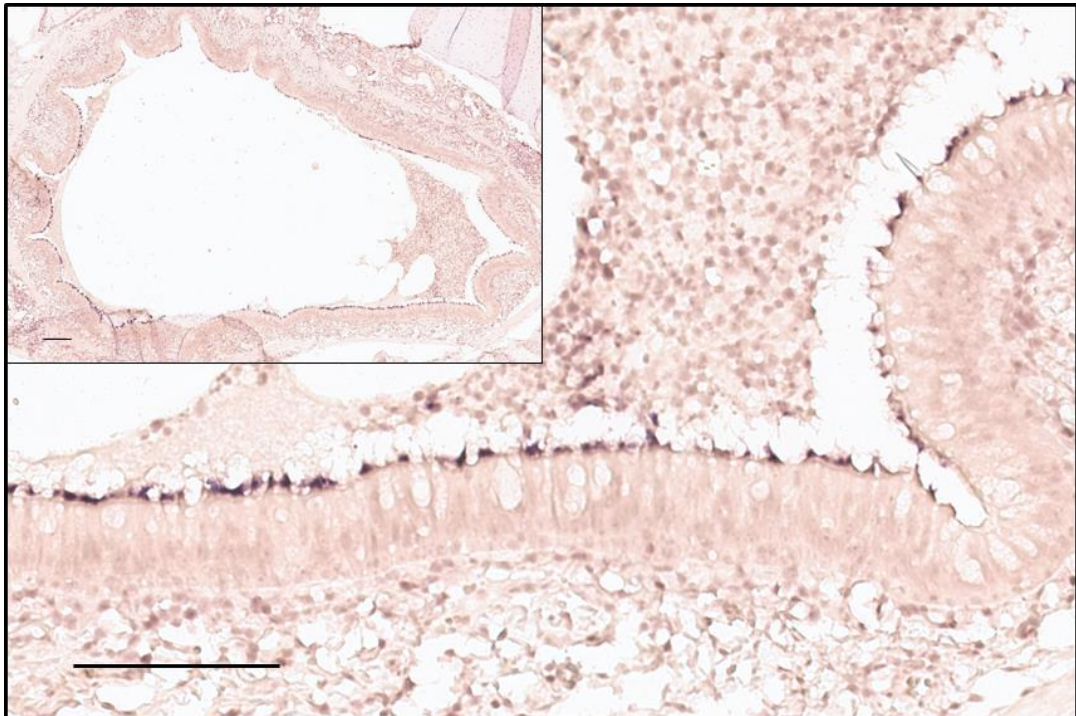
ausgemacht werden. Der Mittelwert der Gesamtsignalmenge der ISH betrug  $1,41 \pm 1,05$ . Der zusätzlich gebildete Summenscore der ISH betrug im Mittel  $3,11 \pm 2,58$  Punkte und reichte von minimal 0 Punkten bis maximal 10 Punkten.



**Abbildung 8:** Beispielhafte Darstellung eines Bronchiolus mit geringgradig positivem Signal auf dem Bronchiolusepithel. Skala entspricht 100µm, In-situ-Hybridisierung. Quelle: Eigene Aufnahme



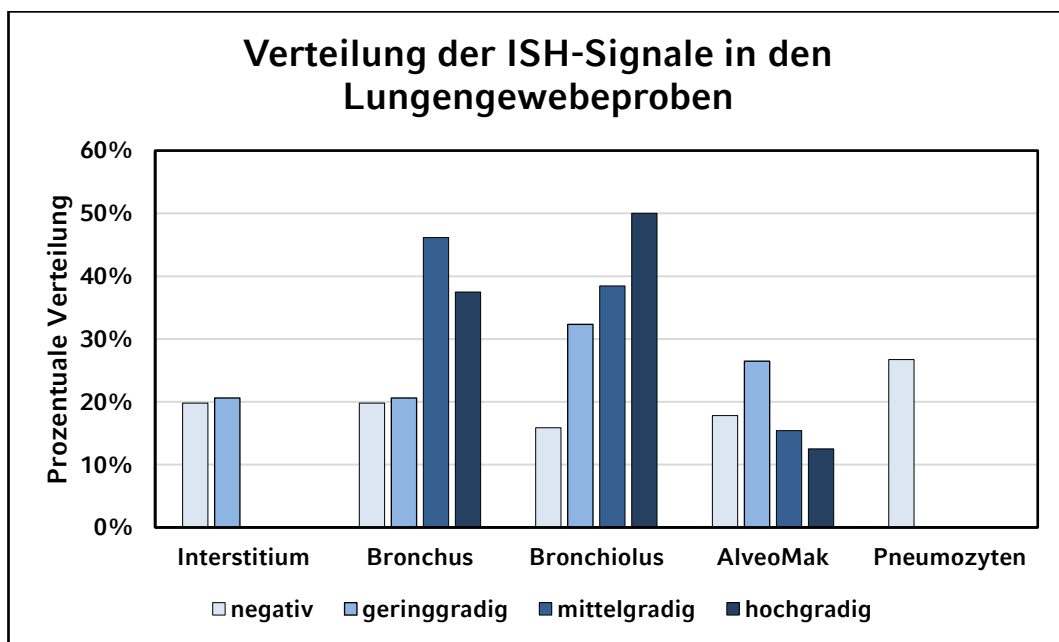
**Abbildung 9:** Beispielhafte Darstellung eines Bronchus mit mittelgradig positivem Signal auf dem Bronchialepithel. Skala entspricht 100µm, In-situ-Hybridisierung. Quelle: Eigene Aufnahme



**Abbildung 10:** Beispielhafte Darstellung eines Bronchus mit hochgradig positivem Signal auf dem Bronchialepithel. Skala entspricht 100µm, In-situ-Hybridisierung. Quelle: Eigene Aufnahme

### 2.3. Verteilung der Grade der ISH auf die Lokalisationen

Außer in den Pneumozyten konnten in allen untersuchten Lokalisationen ISH-Signale beobachtet werden. Wurden ISH-Signale in einem Schnitt gefunden, so waren auch immer ISH-Signale auf den Epithelien der Bronchien und/oder der Bronchiolen zu sehen. Dies bedeutet, dass jede Lungengewebeprobe, welche in der ISH als positiv bewertet wurde, auch immer ISH-Signale auf dem Bronchial- und/oder Bronchiolusepithel zeigte. Entsprechend wurden in den Bronchiolen am häufigsten (20/27 Tiere, 74,1%) ISH-Signale vermerkt, gefolgt von den Bronchien (16/27 Tiere, 59,3%), Alveolarmakrophagen (12/27 Tiere, 44,4%) und dem interstitiellen Gewebe (7/27 Tiere, 25,9%). Die prozentuale Verteilung der Grade der ISH-Signale auf die einzelnen Lokalisationen ist in Abbildung 11 dargestellt.



**Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der ISH-Signale in den Lungengewebeproben: Grade negativ bis hochgradig in den jeweiligen Lokalisationen (AlveoMak= Alveolarmakrophagen)**

### 3. Statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse

#### 3.1. Korrelationen zwischen den quantitativen molekularbiologischen Ergebnissen (qPCR) und den Befunden der ISH

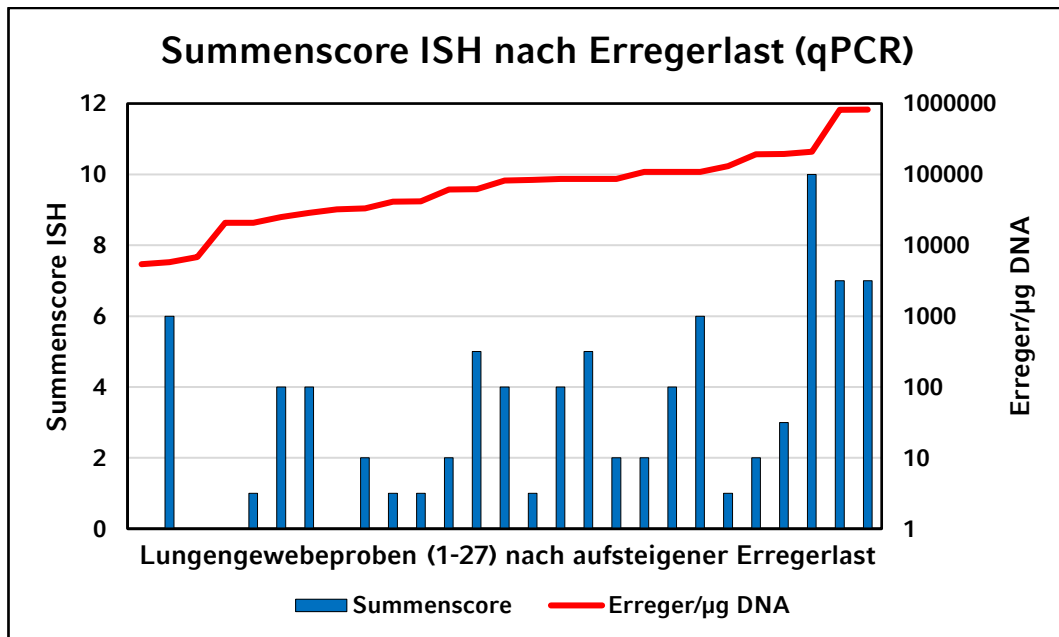
Die Höhe der Gesamtscores der ISH korrelierte signifikant mit der Erregerlast (qPCR) in den Lungengewebeproben (Summenscore (siehe Kapitel IV.2.2):  $r_s = 0,529$ ,  $p = 0,005$ ; Gesamtsignalmenge (siehe Kapitel III.3.4.2):  $r_s = 0,463$ ,  $p = 0,015$ ). Je mehr *M. hyopneumoniae*-spezifische DNA Fragmente mittels qPCR gefunden werden konnten, desto intensiver wurden die ISH-Signale, die in den Lungengewebeproben beobachtet werden konnten.

Die Betrachtung der einzelnen in der ISH untersuchten Geweben zeigte, dass die Intensität der gefundenen ISH-Signale auf dem Bronchial- ( $r_s = 0,519$ ,  $p = 0,006$ ) und Bronchiolusepithel ( $r_s = 0,446$ ,  $p = 0,020$ ) als einzige Unterkategorie aller drei durchgeführten Bewertungsschemata, eine signifikante Korrelation mit der Erregerlast aufwiesen. In Abbildung 12 sind die Summenscores der ISH aller 27 Lungenproben nach aufsteigender Erregerlast dargestellt.

Bei der Untersuchung des Effektes der ISH-Signale einzelner Lokalisationen auf den ISH-Summenscore, zeigte sich, dass alle signifikant mit dem Summenscore der ISH korrelierten (Interstitium:  $r_s = 0,466$ ,  $p = 0,014$ ; Bronchialepithel:  $r_s = 0,806$ ,  $p = <0,001$ ; Bronchiolusepithel:  $r_s = 0,860$ ,  $p = <0,001$ ; Alveolarmakrophagen:  $r_s = 0,697$ ,  $p = <0,001$ ), ausgenommen die Pneumozyten, da in jenen keine ISH-Signale beobachtet werden konnten. Den deutlichsten Effekt auf die Höhe des Summenscores der ISH hatten somit die gefundenen Signale auf dem Bronchial- und Bronchiolusepithel.

Bei der Untersuchung des Effektes der ISH-Signale einzelner Lokalisationen auf die ISH Gesamtsignalmenge, konnten signifikante Korrelationen zwischen der gefundenen Signalmenge auf dem Bronchialepithel ( $r_s = 0,781$ ,  $p = <0,001$ ), auf dem Bronchiolusepithel ( $r_s = 0,881$ ,  $p = <0,001$ ) und innerhalb der Alveolarmakrophagen ( $r_s = 0,585$ ,

$p= 0,001$ ) nachgewiesen werden. Keine Korrelation konnte mit der Signalmenge im Interstitium ( $r_s= 0,332$ ,  $p= 0,091$ ) festgestellt werden.



**Abbildung 12: Lungengewebeproben (1-27) mit dem Summenscore der ISH sortiert nach aufsteigender Erregerlast (Erreger/µg DNA)**

Signifikant korrelierte auch die Kombination von verschiedenen Geweben mit ISH-Signalen mit der Erregerlast. Je mehr *M. hyopneumoniae* spezifische DNA Fragmente mittels qPCR nachgewiesen werden konnten, umso mehr verschiedene anatomische Strukturen zeigten ISH-Signale ( $r_s= 0,451$ ,  $p= 0,018$ ). Eine Übersicht signifikanter Korrelationen bietet Tabelle 11.

**Tabelle 11: Korrelationen zwischen der Erregerlast und den Ergebnissen der In-situ-Hybridisierung (ISH)**

Erregerlast		
Summenscore ISH	$r_s= 0,529$	$p= 0,005$
Signale auf Bronchialepithel	$r_s= 0,519$	$p=0,006$
Signale auf Bronchiolusepithel	$r_s=0,446$	$p= 0,020$



### **3.2. Korrelationen zwischen den Ergebnissen der makroskopischen Untersuchung und der Erregerlast in den Lungengewebeproben (qPCR) sowie den Befunden der ISH**

Statistisch konnten keine Korrelationen zwischen dem Ausmaß der makroskopischen Läsionen, die im Zuge der Schlachttierkörperuntersuchung beurteilt worden waren, und der mittels qPCR ermittelten Erregerlast der Lungengewebeproben ( $r_s = -0,058$ ,  $p = 0,774$ ) oder den Befunden der ISH ( $r_s = -0,108$ ,  $p = 0,593$ ) nachgewiesen werden.

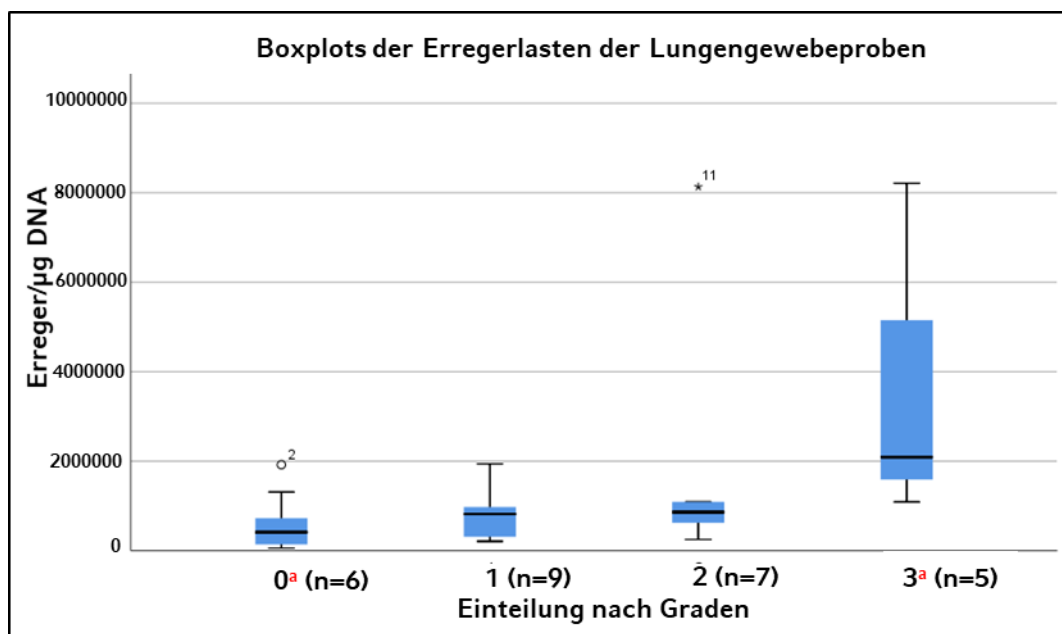
### **3.3. Korrelationen zwischen den Ergebnissen des mikroskopischen HE-Scorings und der Erregerlast in den Lungengewebeproben (qPCR) sowie den Befunden der ISH**

Statistisch konnten keine Korrelationen zwischen den Befunden des mikroskopischen HE-Scorings und der mittels qPCR bestimmten Erregerlast der Lungengewebeproben (qPCR) ( $r_s = 0,570$ ,  $p = 0,778$ ) oder den Befunden der ISH ( $r_s = -0,209$ ,  $p = 0,296$ ) nachgewiesen werden.

### **3.4. Untersuchung auf gruppenbasierte Unterschiede**

Die Auswertung der Daten, basierend auf einer Einteilung *Bronchialepithel positiv ja/nein* als unabhängige Variable und die mittels qPCR erhobenen Erregerlasten als abhängige Variable, zeigte, dass in den Lungengewebeproben mit ISH-Signalen auf dem Bronchialepithel signifikant mehr *M. hyopneumoniae*-spezifische Genomsequenzen in der qPCR gefunden wurde, als in den Lungengewebeproben ohne ISH-Signal ( $p = 0,034$ ). Die weitere statistische Analyse ergab, dass, basierend auf der Einteilung der Daten in vier Gruppen, anhand des ISH-Signals auf dem Bronchialepithel als unabhängige Variable (Gruppe 0: negativ, Gruppe 1: geringgradig ISH-Signale, Gruppe 2: mittelgradig ISH-Signale, Gruppe 3: hochgradig ISH-Signale) ein signifikanter Unterschied der Gruppen bezogen auf die jeweiligen mittleren Erregerlasten als abhängige Variablen vorlag ( $p = 0,047$ ). In der post-hoc Analyse zeigte sich, dass sich Gruppe 0 von Gruppe 3 signifikant unterschied ( $p = 0,043$ ). Dies bedeutet, dass nur zwischen den Schnitten ohne ISH-Signale auf dem Bronchialepithel und den Schnitten mit hochgradig ISH-Signalen auf dem

Bronchialepithel ein signifikanter Unterschied in den gemessenen *M. hyopneumoniae*-spezifischen Genomsequenzen vorlag. Abbildung 13 zeigt die Erregerlasten der Lungengewebebeurteilungen gruppiert nach Signalstärken auf dem Bronchialepithel. Die mittleren Erregerlasten und die Standardabweichung sowie die minimale (min.) und maximale (max.) Erregerlast in Erreger/ $\mu\text{g}$  DNA der Gruppen des Bronchialepithels lagen bei: **Gruppe 0:**  $5,65 \times 10^4 \pm 5,89 \times 10^4$ , min.:  $5,41 \times 10^3$ , max.:  $1,92 \times 10^5$ ; **Gruppe 1:**  $7,91 \times 10^4 \pm 6,09 \times 10^4$ , min.:  $2,08 \times 10^4$ , max.:  $1,94 \times 10^5$ ; **Gruppe 2:**  $1,97 \times 10^5 \pm 3,03 \times 10^5$ , min.:  $2,50 \times 10^4$ , max.:  $8,13 \times 10^5$ ; **Gruppe 3:**  $3,80 \times 10^5 \pm 3,85 \times 10^5$ , min.:  $1,09 \times 10^5$ , max.:  $8,21 \times 10^5$ .



**Abbildung 13: Boxplots der Erregerlasten der Lungengewebebeurteilungen aus der qPCR gruppiert nach Graden (0-3) der Signalstärken auf dem Bronchialepithel (a: markiert signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen)**

Weitere statistische Untersuchungen, basierend auf einer Gruppeneinteilung nach Ergebnissen des ISH-Scorings, ergaben keine weiteren signifikanten Unterschiede.

#### 4. Berechnung der Sensitivität und des positiven Vorhersagewertes der durchgeführten In-situ-Hybridisierung

Zur Kalkulation der Sensitivität der ISH in Kombination mit dem verwendeten Scoring wurde eine Kontingenztafel erstellt (Tabelle 12). Die

nachfolgende Berechnung ergab eine Sensitivität der ISH in dieser Studie von 77,78% mit der Annahme, dass die qPCR der Goldstandard im Nachweis von *M. hyopneumoniae*-spezifischen Genomsequenzen ist. Für Tiere mit Erregerlasten  $\geq$  Median erreichte die ISH eine Sensitivität von 92,86%.

**Tabelle 12: Kontingenztafel zur Kalkulation der Sensitivität der In-situ-Hybridisierung (n= 27)**

Testergebnis	infiziert	nicht infiziert
positives Ergebnis	richtig positiv (n=21)	falsch positiv (n=0)
negatives Ergebnis	falsch negativ (n=6)	richtig negativ (n=0)

Die Ermittlung des positiven Vorhersagewertes der ISH ergab 100%. Dieser spiegelt die fehlerhaften ISH-Signale wider und gibt an wie viele der positiven ISH-Signale tatsächlich positiv waren. In der vorliegenden Studie traf dies auf alle ISH-Signale zu.





## V. DISKUSSION

Ziel der durchgeführten Studie war es, *M. hyopneumoniae*-DNA intraläsional mithilfe einer ISH darzustellen. Die im Zuge der Auswertung der ISH gemachten Beobachtungen sollten anschließend, insbesondere im Hinblick auf die Qualität ihrer diagnostischen Aussagekraft, auf einen Zusammenhang mit weiteren Nachweisverfahren hin untersucht werden.

### 1. Nachweis von *M. hyopneumoniae*-DNA mittels ISH

Die verwendete ISH konnte *M. hyopneumoniae*-DNA in Lungengewebeproben von Schweinen, die während der Schlachttierkörperuntersuchung gewonnen wurden, sichtbar machen. Zur Durchführung der ISH in der vorliegenden Untersuchung wurde eine bereits in einer ISH bewährte Sonde, die mit der 16S rRNA von *M. hyopneumoniae* hybridisiert, verwendet (BOYE et al., 2001). Außerdem wurde die Sonde mit Digoxigenin gekoppelt, wobei die Sichtbarmachung der Sonde auf Basis einer Antikörperreaktion und enzymatisch induzierter Farbreaktion erfolgte. Hierdurch wurde eine möglichst praktikable Auswertung gewährleistet (KWON & CHAE, 1999). Die Vorteile hierbei vergleichend zu einer fluoreszenzbasierten ISH bestehen darin, dass die Gewebeschnitte zum einen ohne zusätzliches spezielles Equipment beurteilt werden können. Folglich können Labore hierzu auf Standardausrüstung wie ein gewöhnliches Lichtmikroskop zurückgreifen. Zum anderen sind die umliegenden Gewebestrukturen der untersuchten Probe unter einem Lichtmikroskop durch die auf Hämalaun-Eosin basierende Färbung deutlicher zu erkennen, wodurch eine bessere Beurteilung und einfachere anatomische Zuordnung der Signale möglich ist.

Der intraläsionale Erregernachweis gelang mit einer Sensitivität von 77,78%, basierend auf den Ergebnissen der qPCR als Goldstandard. Außerdem wurde der positive Vorhersagewert der ISH bestimmt, welcher bei 100% lag. Dies bedeutet, dass jede Lungengewebeprobe, die ISH-Signale aufwies, auch tatsächlich *M. hyopneumoniae*-spezifische Genomsequenzen beinhalten. Sowohl die erreichte Sensitivität als auch

der positive Vorhersagewert bestätigen die Ergebnisse einer vorangegangenen Studie (PEREIRA et al., 2017). Insbesondere relevant für Feldinfektionen könnte allerdings die Erkenntnis von PEREIRA et al. (2017) sein, dass die Sensitivität ihrer Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) bei einer simultanen Infektion mit *M. hyorhinis* abnahm. Außerdem konnten PEREIRA et al. (2017) zeigen, dass die verwendete FISH mit 75% deutlich sensitiver war als die an denselben Proben durchgeführte IHC, die nur eine Sensitivität von 40% aufwies. Da in der vorliegenden Arbeit die Lungengewebeproben weder auf Ko-Infektionen hin untersucht wurden, noch eine IHC durchgeführt wurde, können diese Ergebnisse nicht verglichen werden. Jedoch erwies sich die ISH in vorliegender Studie sensitiver je mehr Erreger im Gewebe waren. Ursächlich für die Diskrepanzen bezüglich der Sensitivität verglichen mit PCR-basierten Verfahren könnte auch in dieser Arbeit, wie bereits von PEREIRA et al. (2017) angemerkt, die unterschiedliche Menge an beprobtem Material sein. So spiegelt die ISH den nur wenige µm dicken Anschnitt einer Probe wider, wohingegen die qPCR in dieser Arbeit die extrahierte *M. hyopneumoniae*-DNA von etwa 2,5g Lungengewebeprobe umfasste. Dies würde auch erklären, weshalb die Sensitivität der ISH in der vorliegenden Arbeit bei höherer Erregerlast anstieg. Dennoch führen die beschriebenen Übereinstimmungen zu dem Schluss, dass das verwendete Verfahren eine zuverlässige Methode zum direkten und im Kontext zu den Läsionen stehenden Nachweis von *M. hyopneumoniae* darstellt.

Als generelle Lösung zur Steigerung der Sensitivität für alle visualisierenden In-situ-Nachweisverfahren für *M. hyopneumoniae* schlagen PIETERS und MAES (2019) vor, mehrere Schnitte aus mehreren Lokalisationen der Lunge anzufertigen. Jedoch würde damit zwar im Allgemeinen die Sensitivität erhöht werden, aber der damit zu erbringende diagnostische Aufwand zunehmend größer. Dies hätte zur Folge, dass deutlich mehr Zeit von dem technischen Personal des diagnostizierenden Labors aufgewendet werden müsste, was das Verfahren letztendlich langwierig, teuer und in der Routinediagnostik impraktikabel machen würde.

Des Weiteren beeinflusst die Problematik der über den zeitlichen Verlauf

einer Infektion mit *M. hyopneumoniae* variierenden Anzahl an Erregern im Gewebe die ISH maßgeblich, was in Untersuchungen mit widersprüchlichen Ergebnissen gezeigt werden konnte (KWON & CHAE, 1999; KWON et al., 2002). So konnten KWON und CHAE (1999) aus Lungengewebe von Schweinen unterschiedlichen Alters mittels ISH *M. hyopneumoniae*-DNA an verschiedensten Lokalisationen nachweisen. Sie vermuteten, dass die anatomischen Lokalisationen in denen ISH-Signale gefunden wurden in einem Zusammenhang mit dem zeitlichen Infektionsverlauf stehen könnten. In einer Folgestudie fand dieselbe Forschergruppe im zeitlichen Verlauf der Infektion jedoch an anderen Lokalisationen ISH-Signale als in der vorangegangenen Untersuchung (KWON et al., 2002). In vorliegender Arbeit wurde der genaue Infektionszeitpunkt zwar nicht erhoben, jedoch ist davon auszugehen, dass die beprobten Tiere sehr variable Infektionszeitpunkte hatten. Dies ist darauf zurückzuführen, dass bei Feldinfektionen meist zunächst wenige Tiere betroffen sind und sich weitere Tiere erst allmählich mit *M. hyopneumoniae* infizieren (VILLARREAL et al., 2011; ROOS et al., 2016; PIETERS & MAES, 2019). Bezugnehmend auf die Beobachtungen der asiatischen Forschergruppen KWON und CHAE (1999) und KWON et al. (2002) konnte mit der ISH in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass Lungengewebeproben, die während der Schlachttierkörperuntersuchung gewonnen wurden, vor allem die Epithelien der Bronchien und Bronchiolen ISH-Signale zeigen (vergleiche Kapitel V.2).

Sowohl im Modell als auch im Feldversuch erwies sich der als Sonde verwendete DNA-Abschnitt als hochspezifisch für *M. hyopneumoniae* (BOYE et al., 2001; PEREIRA et al., 2017). Der gewählte, sondenkomplementäre Genomabschnitt in der 16S rRNA der Bakterien eignet sich einerseits als hochspezifische und andererseits als sehr stark amplifizierte Region besonders gut als Zielsequenz (vergleiche Kapitel II.2.5.1). Um in der vorliegenden Studie die genaue Spezifität der ISH zu bestimmen wären Lungengewebeproben von SPF-Tieren aus beispielsweise Infektionsversuchen notwendig gewesen. Deshalb wurde von einer erneuten Überprüfung der Spezifität der Sonde abgesehen. Bei ersten Testdurchläufen der in vorliegender Arbeit durchgeführten ISH lag

außerdem das Problem darin, dass verwendete Schnitte keinerlei ISH-Signale aufwiesen, obwohl die Schnitte von Lungengewebeproben stammten, in denen sowohl mittels PCR *M. hyopneumoniae* als auch pathomorphologische und EP-typische Läsionen nachgewiesen wurden. Dies deutete bereits an, dass eher die Sensitivität der ISH eine potentielle Fehlerquelle darstellen könnte als die Spezifität. PEREIRA et al. (2017) benutzten für eine ISH in einer vergleichenden Untersuchung intraläsionaler Erregernachweisverfahren dieselbe Sonde wie für die ISH in der vorliegenden Studie zum Einsatz kam. Die Brasilianer konnten bei der ISH eine Spezifität der Sonde für *M. hyopneumoniae* von 100% zeigen, wohingegen die IHC nur eine Spezifität von 73,3% aufwies. Zurückzuführen könnte dies auf Kreuzreaktionen mit antigenen Strukturen weiterer *Mycoplasma spp.*, beispielsweise *Mycoplasma hyorhinis*, sein (PEREIRA et al., 2017). Hinweise für solche Kreuzreaktionen wurden bereits in einer früheren Arbeit aufgeführt (CHEIKH SAAD BOUH et al., 2003). Ein Nachweis basierend auf hochspezifischen Genomabschnitten des Zielorganismus erweist sich demzufolge als die Methode der Wahl beim intraläsionalen Erregernachweis von *M. hyopneumoniae*.

In Summe demonstrieren die höhere Sensitivität bei überlegener Spezifität und eine mit geringerem labortechnischem Aufwand verbundene Auswertung bei gleichzeitig größerem Informationsgehalt der Ergebnisse die Überlegenheit der durchgeführten ISH gegenüber Verfahren, die zum intraläsionalen Erregernachweis auf fluoreszierende Sonden zurückgreifen.

## **2. Korrelationen der ISH mit den in der qPCR ermittelten Erregerlasten**

Sowohl der Gesamtscore ( $r_s = 0,463$ ,  $p = 0,015$ ) als auch der Summenscore ( $r_s = 0,529$ ,  $p = 0,005$ ) der ISH waren signifikant mit den mittels qPCR gefunden Erregerlasten assoziiert. Je mehr *M. hyopneumoniae*-spezifisches Genommaterial folglich mithilfe der qPCR gefunden wurde, desto stärker stellten sich auch die gefundenen ISH-Signale dar. Von einer zusätzlichen, genauen Zählung der Anzahl der ISH-Signale wurde in der vorliegenden Arbeit abgesehen. Dies beruhte darauf, dass immer der

gesamte Gewebeanschnitt in die Auswertung miteinbezogen wurde und folglich die Größe der untersuchten Lungengewebeprobe immer zufällig war. Berücksichtigt man dies, so hätte eine numerische Erfassung der Lokalisationen in ihrer Häufigkeit wenige Vergleichsmöglichkeiten zwischen den Ergebnissen mehrerer Lungengewebeproben geboten. In diesem Aspekt vergleichbare Studien liegen dem Autor dieser Arbeit zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht vor. Dies ist dem Umstand geschuldet, dass in anderen Studien mit Durchführung einer ISH zum Nachweis von *M. hyopneumoniae* die Signalmenge nur nominal erfasst wurde und somit keine Rückschlüsse auf die Qualität und Quantität der ISH-Signale mehr möglich waren. Deshalb konnten diese Untersuchungen auch keine Korrelation zwischen der Erregerlast und der Gesamtsignalmenge in der ISH herstellen (KWON & CHAE, 1999; BOYE et al., 2001; KWON et al., 2002; PEREIRA et al., 2017). Die Korrelation zwischen der mittels qPCR bestimmten Menge an *M. hyopneumoniae* spezifischen Genomsequenzen und der ermittelten Signalmenge der ISH in der vorliegenden Arbeit zeigt jedoch, dass die ISH die tatsächlich vorhandene Erregermenge weitgehend abbilden kann. Somit wurde demonstriert, dass diese ISH als diagnostische Parallele eines qPCR-basierten Nachweisverfahrens für *M. hyopneumoniae* zu betrachten ist.

Besonders mit den Gesamtscores der ISH assoziiert waren die ISH-Signale auf dem Bronchial- und Bronchiolusepithel. Dies bedeutet, dass die Signalmenge und Intensität in der ISH auf den Epithelien dieser beiden luftführenden Strukturen der Lunge maßgeblich für die Gesamtbewertung der Lungengewebeprobe im Hinblick auf die ISH sind. Folglich steigen und intensivieren sich mit zunehmender Erregerlast in der qPCR auch immer die ISH-Signale auf dem Bronchial- und/oder Bronchiolusepithel. Somit sind diese beiden Lokalisationen hauptverantwortlich für einen Anstieg des Gesamtscores der ISH. Diese beiden Lokalisationen wurden auch in anderen Studien mit visualisierenden Nachweisverfahren als Prädilektionsstellen für *M. hyopneumoniae* hervorgehoben (KWON & CHAE, 1999; BOYE et al., 2001; OPRIESSNIG et al., 2004; MEYNS et al., 2006; PEREIRA et al., 2017). Somit konnte bestätigt werden, dass das

Bronchial- und Bronchiolusepithel das Zielgewebe von *M. hyopneumoniae* darstellt (BLANCHARD et al., 1992). Für weitere Untersuchungen mit Durchführung eines In-situ Nachweises von *M. hyopneumoniae* ist also unbedingt anzuraten, besonderes Augenmerk auf diese beiden Strukturen bei der Beurteilung der zu untersuchenden Probe zu legen. Des Weiteren könnten diese Beobachtungen sogar bedeuten, dass die Signale an anderen Lokalisationen für die Gesamtbewertung einer Probe, die nach Feldinfektion mit *M. hyopneumoniae* im Zuge der Schlachttierkörperuntersuchung gewonnen wurde, als irrelevant anzusehen sind. Insbesondere auf die Geschwindigkeit der Beurteilung einer vorliegenden Probe würde sich dies positiv auswirken. Die Überprüfung der gesamten Lungengewebeprobe auf ISH-Signale führte in der vorliegenden Studie zu einem nicht unerheblichen zeitlichen Mehraufwand. Müssten nun lediglich die prominenten und leicht zu lokalisierenden Bronchien und Bronchiolen aufgesucht und auf ISH-Signale hin geprüft werden, würde dies die Auswertung der ISH deutlich beschleunigen. Besonders in der alltäglichen Routinediagnostik für die Bestandsbetreuung könnte dieser Umstand von Nutzen sein, da dadurch Zeit gespart, und die Diagnostik somit preiswerter angeboten werden könnte. Jedoch könnte, wie von KWON et al. (2002) vermutet, der Ort des Nachweises Hinweise über das Alter der Läsionen und somit auch über den Infektionszeitpunkt liefern. Diese Information wäre wiederum für den bestandsbetreuenden Tierarzt von besonderer Bedeutung, da er mit diesem Wissen den Zeitpunkt für prophylaktische Maßnahmen zur Abwendung einer EP festlegen könnte. Somit sind noch weitere Untersuchungen notwendig, um das diagnostisch sinnvolle Spektrum an Geweben, die im Zuge der Beurteilung von Schnitten einer ISH auf ISH-Signale hin untersucht werden sollten, genau festzulegen.

### **3. Relevanz einer ISH zum Nachweis von klinischen Infektionen durch *M. hyopneumoniae***

Ein Zusammenhang zwischen der mittels ISH nachgewiesenen für *M. hyopneumoniae* spezifischen 16S rRNA und der Pathomorphologie einer Feldinfektion mit *M. hyopneumoniae* konnte in der vorliegenden

Studie nicht ermittelt werden. Folglich konnten weder mit den Gesamtscores noch mit einzelnen Lokalisationen der ISH Korrelationen mit den Ergebnissen der Beurteilung von Lungenläsionen im Zuge der Schlachttierkörperuntersuchung oder mit dem histologischen Scoring der Lungenläsionen nachgewiesen werden. Ebenso konnte keine Assoziation zwischen der mithilfe der qPCR nachgewiesenen Anzahl an *M. hyopneumoniae* spezifischen Genomsequenzen, den makroskopischen Veränderungen und dem histologischen Scoring festgestellt werden. Dies steht in klarem Widerspruch zu vorherigen Untersuchungen. In einer Feldstudie von HILLEN et al. (2014) zur Untersuchung dreier Vakzine gegen *M. hyopneumoniae* korrelierten die untersuchten histologischen Läsionen, die Ergebnisse des Schlachtlungenscores nach MADEC und KOBISCH (1982) und die mittels qPCR gemessenen Erregerlasten signifikant. In weiteren Feldversuchen wurden vergleichbare Assoziationen nachgewiesen (CALSAMIGLIA et al., 2000; SIBILA et al., 2007; NATHUES et al., 2012). Obwohl die erwähnten Untersuchungen nicht die Relevanz der ISH bei der klinischen Diagnostik untersuchten, so demonstrierten sie doch den Zusammenhang der mittels qPCR gemessenen Erregerlast mit den pathomorphologischen Untersuchungsmethoden. Somit stehen Ergebnisse einer qPCR zum Nachweis von *M. hyopneumoniae* in diesen Studien in einer Relation zu den klinisch-pathologischen Befunden. Dies führt im Umkehrschluss zu der Frage, ob in den erwähnten Studien die Befunde einer zusätzlich durchgeführten ISH auch mit den pathomorphologischen Befunden korreliert hätten. Insbesondere im Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, in der die Ergebnisse der qPCR mit den Befunden der ISH korrelierten, erscheint diese Vermutung als nicht unwahrscheinlich. Um dies jedoch zu demonstrieren sind weitere Untersuchungen notwendig. Würde es aber gelingen mittels weiterer Studien einerseits auch die Ergebnisse der ISH in Relation zu makroskopischen und mikroskopischen Befunden darzustellen und andererseits die Gewebe, welche ISH Signale aufweisen, in einen Zusammenhang mit dem Infektionszeitpunkt zu setzen (vergleiche Seite 62), könnte die ISH eine PCR im diagnostischen Dreieck aus Klinik, Pathomorphologie und Erregernachweis zumindest teilweise ablösen. Die



Vorteile einer ISH im Gegensatz zu einer PCR könnten dann zumindest in der p.m. Diagnostik einer EP überwiegen, da sie nicht nur die Anwesenheit von *M. hyopneumoniae* spezifischen Genomsequenzen zeigen würde, sondern diese auch intraläsional darstellen würde und gleichzeitig Informationen über den Infektionszeitpunkt und die Ausprägung EP-typischer Läsionen und somit das Ausmaß der Erkrankung in betroffenen Tieren liefern könnte. Dennoch wird die PCR bei der Diagnostik im Zuge der Bestandsbetreuung nach wie vor ein wichtiges Instrumentarium bleiben, da sie im Gegensatz zur ISH für Screenings zum Nachweis von *M. hyopneumoniae*, beispielsweise mittels LT oder OF, bei Schweinen jeder Altersstufe in vivo angewendet werden kann (BLANCHARD et al., 1996; CALSAMIGLIA et al., 1999; VERDIN et al., 2000; KURTH et al., 2002; PIETERS et al., 2017; RAWAL et al., 2018; DEFFNER, 2020).

Die Impfung der in der vorliegenden Studie eingeschlossenen Tiere gegen *M. hyopneumoniae* könnte die Ergebnisse des Schlachtlungen- und des histologischen Scorings maßgeblich beeinflusst haben. Dass eine Impfung von Schweinen gegen *M. hyopneumoniae* die Ausprägung EP-typischer Läsionen deutlich reduziert, konnte demonstriert werden (MAES et al., 1999; BACCARO et al., 2006; HILLEN et al., 2014; BEFFORT et al., 2017; SIPOS et al., 2020). Zudem werden eine Verbreitung des Erregers zwischen den Tieren und eine folgende Infektion zwar nicht unterbunden, jedoch sinken nachweisbare Erregerlasten und die klinische sowie pathomorphologische Ausprägung werden reduziert (vergleiche Kapitel II.3). Inwieweit eine Impfung auch die Ergebnisse einer ISH beeinträchtigt wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht. Da eine Impfung nahezu alle diagnostischen Parameter beeinflusst kann dennoch davon ausgegangen werden, dass zwar das Ausmaß der makroskopischen Läsionen und der Grad der histologisch evaluierten Läsionen sowie die mittels qPCR quantifizierten *M. hyopneumoniae*-spezifischen Genomsequenzen und auch die Höhe der Gesamtscores der ISH durch eine Impfung gegen *M. hyopneumoniae* reduziert werden. Allerdings sollte die Impfung somit auch keinen Einfluss auf die Zusammenhänge unter den einzelnen Parametern haben, da alle Parameter betroffen wären.

Dies wäre für die ISH von Vorteil, da ihre diagnostische Gewichtung somit unabhängig vom Impfstatus der untersuchten Tiere wäre, was beispielsweise bei serologischen Nachweisverfahren ein großes Problem darstellt (MAES et al., 2018).

Die verwendeten Lungengewebeproben wurden alle im Zuge der Beurteilung von Lungenläsionen bei der Schlachttierkörperuntersuchung gewonnen. Da das Ausmaß der durch *M. hyopneumoniae* verursachten Lungenläsionen nach wenigen Wochen p.i. bereits wieder stark abnehmen kann, könnte dadurch das Ergebnis der Beurteilung der Lungenläsionen im Rahmen der Schlachttierkörperuntersuchung milder ausfallen, als dies ein oder zwei Wochen vor Schlachttermin der Fall gewesen wäre. Dadurch kann einerseits die Rolle von *M. hyopneumoniae* in einem respiratorischen Krankheitskomplex unterschätzt oder verkannt werden. Andererseits könnte dies in einer Studie, wie der vorliegenden, dazu führen, dass die mittels qPCR bestimmten Erregerlasten nicht mit den makroskopischen Befunden korrelieren. Um diesen Faktor jedoch auszuschalten, müssten gesichert akut infizierte Tiere bei einem EP-Ausbruch oder im Zuge eines Infektions- und damit Tierversuches herangezogen werden. Alternativ könnten somit auch Tiere eines EP-Verdachtsbetriebes zum Zeitpunkt des Auftretens von Husten verwendet werden (NATHUES et al., 2012). Allerdings ist die Bereitschaft der Landwirte ein Tier vor der Schlachtung aufgrund einer nicht letalen Erkrankung zu töten in der Regel gering. Außerdem müsste die Probennahme dann, um dem gesetzlichen Rahmen zu entsprechen, im Zuge der bestandsbetreuenden Diagnostik zur Abwendung weiteren Leidens für die restliche Herde geschehen. Aus diesen Gründen wurde für die vorliegende Studie die Probennahme über den klassischen Weg des Monitorings der EP gewählt, was jedoch dazu geführt haben könnte, dass die Ergebnisse der ISH in keinen Zusammenhang mit den pathomorphologischen Befunden gebracht werden konnten.

Von weiterem Interesse wäre gewesen, einen diagnostischen Cut-off Wert der ISH zu ermitteln. Dieser könnte Aufschluss über einerseits den Mindestgehalt an *M. hyopneumoniae* spezifischen Genompartikeln in der Gewebeprobe bei einem ISH-Signal geben. Bei ausbleibenden Signalen in

der ISH könnte andererseits davon ausgegangen werden, dass in der verwendeten Gewebeprobe eine bestimmte Anzahl DNA-Sequenzen nicht überschritten wurde. Jedoch stellt die Quantifizierung von Informationen aus zweidimensionalen histologischen Schnitten ein generelles Problem dar. Folglich wären Rückschlüsse eher bezüglich der Sensitivität der ISH als auf die allgemeine Pathogenbelastung der verwendeten Gewebeprobe möglich. Sinnvoll wäre hierfür die Lungengewebeprobe für die ISH und für die qPCR aus einem Stück Lunge zu entnehmen, sodass beide Verfahren den Erregergehalt von Gewebe in unmittelbarer Nachbarschaft darstellen. FUTO et al. (1992) ermittelten die minimale Konzentration von *M. hyopneumoniae*, die für eine RNA-DNA-Hybridisierung notwendig ist. Hierfür verwendeten sie ein Modell, in welchem verschiedene Verdünnungsstufen einer Bakterienkultur mit *M. hyopneumoniae* auf eine Membran aufgebracht wurden. Dieses Modell wäre für eine ISH vermutlich nicht geeignet, da die Verteilung der Bakterien im Gewebe und damit gegebenenfalls verbundene Problematiken nicht berücksichtigt werden würden. Die Injektion verschiedenkonzentrierter Bakteriensuspensionen in Gewebeproben wäre aufgrund der bereits angeführten Problematik der Quantifizierung in der Histologie ebenfalls wenig aussagekräftig. Eine Lösung könnte eine Studie mit größeren Fallzahlen bieten. Aus den Informationen der mit dem Lungengewebe der Tiere durchgeführten ISH und qPCR könnte dann statistisch ein repräsentativer Grenzwert bestimmt werden.

## VI. ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Eignung einer In-situ-Hybridisierung (ISH) zum Nachweis von 16S rRNA von *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* im Rahmen der Diagnostik der Enzootischen Pneumonie (EP) an Lungen, welche im Zuge der Schlachttierkörperuntersuchung gewonnen wurden, zu überprüfen. Ein Kernpunkt hierbei sollte sein, mögliche Korrelationen zwischen den Ergebnissen einer qPCR (quantitative polymerase chain reaction) und der Pathomorphologie der EP mit den Befunden einer am Institut für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München neu etablierten ISH zum Nachweis von *M. hyopneumoniae* zu finden.

Hierfür wurden Lungengewebeproben von 27 Tieren aus einem hessischen Schweinebestand, der vorberichtlich respiratorische Symptome im Sinne einer EP zeigte, untersucht. Im Vorfeld der Arbeit wurden alle Lungengewebeproben mittels qPCR positiv auf *M. hyopneumoniae* getestet. Außerdem lagen die Ergebnisse der Beurteilung von makroskopischen Lungenläsionen im Zuge der Schlachttierkörperuntersuchung vor. Zusätzlich wurde an den Lungengewebeproben eine ISH durchgeführt. Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurden diese Daten durch die Ergebnisse adaptierter Bewertungsschemata, zur Auswertung mikroskopischer Läsionen und zur Erfassung und Taxierung der Signale der ISH, ergänzt.

Die Lungen aller Tiere wiesen am Schlachthof pathologische Veränderungen auf und erreichten im Schlachtlungen-Scoring nach MADEC und KOBISCH (1982) zwischen 1 bis 20 (von 24) Punkte. Die größte Ausdehnung wiesen die Läsionen im akzessorischen Lungenlappen und in den Mittellappen auf. Histologisch wurde ein durchschnittlicher Grad von  $16,70 \pm 3,58$  (von 24) Punkten erreicht, bei minimal 9 und maximal 23 Punkten. Im Mittel war die peribronchiale und peribronchioläre Infiltration mit Entzündungszellen am prominentesten ausgeprägt, wohingegen sich Exsudat in den Alveolen am mildesten darstellte. Alle Lungen wiesen eine Hyperplasie des Bronchus-assoziierten

lymphatischen Gewebes auf. In den Lungengewebeproben konnte mittels ISH bei 21 Tieren die 16S rRNA von *M. hyopneumoniae* nachgewiesen werden. ISH-Signale konnten bei allen ISH positiven Lungengewebeproben immer auch auf dem Bronchial- und/oder dem Bronchiolusepithel nachgewiesen werden. Zudem wurden an diesen beiden Lokalisationen die intensivsten Signale beobachtet. Die statistische Auswertung konnte die besondere Gewichtung des Bronchialepithels als Lokalisation für ISH-Signale hervorheben. Der Summenscore der ISH korrelierte signifikant mit der Anzahl mittels qPCR bestimmten *M. hyopneumoniae*-spezifischen Genomsequenzen ( $r_s = 0,529$ ,  $p = 0,005$ ). Ebenso korrelierten auch die Signalstärken der ISH in Bronchial- ( $r_s = 0,519$ ,  $p = 0,006$ ) und Bronchiolusepithel ( $r_s = 0,446$ ,  $p = 0,020$ ) mit der Menge mittels qPCR bestimmter *M. hyopneumoniae*-spezifischen Genomsequenzen. Die Sensitivität der ISH lag bei 77,78%. Ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis der 16S rRNA von *M. hyopneumoniae* mittels ISH und den Ergebnissen der Beurteilung von Lungenläsionen im Zuge der Schlachttierkörperuntersuchung oder den histologischen Befunden konnte mit diesem Versuchsaufbau nicht nachgewiesen werden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die durchgeführte ISH ein praktikables und anwenderfreundliches Verfahren zum intraläsionalen Erregernachweis von *M. hyopneumoniae*-DNA darstellt und die tatsächliche Erregerlast und deren Lokalisation gut widerspiegelt. Besondere Prädilektionsstellen für ISH-Signale sind hierbei die Epithelien der Bronchien und der Bronchiolen. Eine Korrelation der Ergebnisse der ISH mit makroskopischen oder histologischen Befunden konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Daher erlauben die Ergebnisse einer ISH bei Lungen, welche im Rahmen der Schlachttierkörperuntersuchung gewonnen wurden, keinen Rückschluss auf das Ausmaß der Erkrankung in betroffenen Tieren. Hierfür wären weiterführende Untersuchungen, beispielsweise in akuten Erkrankungsstadien, notwendig.

## VII. SUMMARY

The objective of the present study was to evaluate the ability of an in-situ hybridization (ISH) for the diagnosis of *Mycoplasma (M.) hyopneumoniae* using samples of *M. hyopneumoniae* infected pigs which were taken during the lung lesion evaluation at carcass inspection at slaughter. A main point was to find possible correlations between the results of a qPCR (real-time polymerase chain reaction) and pathomorphology with the findings of an ISH for the detection of *M. hyopneumoniae* newly established at the Institute of Veterinary Pathology, Ludwig-Maximilians-University Munich.

For this purpose, lung tissue samples of 27 animals from a pig herd in Hessen, Germany, which showed pre-reportable respiratory symptoms indicative for enzootic pneumonia (EP), were examined. Prior to the work, all lung tissue samples were tested positive for *M. hyopneumoniae* by qPCR. Furthermore, the results of the assessment of the macroscopic lung lesions in the course of the ante-mortem examination were available. In addition, ISH was performed on the lung tissue samples. In the course of the present work, these data were supplemented by the results of adapted scoring systems, for evaluation of microscopic lesions and for the detection and quantification of signals of ISH.

The lungs of all animals showed pathological changes at the lung lesion evaluation during carcass inspection and were scored between 1 to 20 (out of 24) points in the slaughterhouse lung evaluation according to the scoring described by MADEC and KOBISCH (1982). Lesions in the accessory lobe of the lung and in the middle lobes showed the greatest extent. Histologically, an average grade of  $16.70 \pm 3.58$  (out of 24) points was obtained with a minimum of 9 and a maximum of 23 points. On average, peribronchial and peribronchiolar infiltration with inflammatory cells was most prominent, whereas the extension of the exudate in the alveoli was mildest. All lungs showed hyperplasia of bronchus-associated lymphoid tissue. In the lung tissue samples, 16s rRNA of *M. hyopneumoniae* was detected by ISH in 21 animals. ISH signals could always be detected on the bronchial and/or bronchiolar epithelium in all

ISH positive lung tissue samples. Moreover, the most intense signals were observed at these two localizations. Statistical analysis was able to highlight the particular emphasis of the bronchial epithelium as a localization for ISH signals. The sum score of ISH correlated significantly with the bacterial load determined by qPCR ( $r_s = 0.529$ ,  $p = 0.005$ ). Similarly, signal strengths in bronchus ( $r_s = 0.519$ ,  $p = 0.006$ ) and bronchiolar epithelium ( $r_s = 0.446$ ,  $p = 0.020$ ) also correlated with bacterial load. The sensitivity of ISH was 77.78%. No correlation of the ISH results with pathomorphologic findings was demonstrated.

The results of the present study demonstrate that the ISH performed is a practical and user-friendly method for intralesional detection of *M. hyopneumoniae*-DNA and reflects the actual pathogen load and its localization well. Particular predilection sites for ISH signals were the epithelia of the bronchi and bronchioles. However, correlation of ISH results with macroscopic or histologic findings has not been demonstrated. Therefore, the results of the ISH in lungs obtained during carcass examination do not allow conclusions to be drawn regarding the extent of the disease in affected animals. For this, further investigations, for example in acute disease stages, would be necessary.

## VIII. TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 1: In der Literatur mit M. hyopneumoniae assoziierte mikroskopische Läsionen .....</i>	23
<i>Tabelle 2: BALT-Ausbildungsstadien nach FALKENAU (2015).....</i>	25
<i>Tabelle 3: Bewertungsschema für Lungenläsionen je Lappen nach MADEC und KOBISCH (1982) .....</i>	30
<i>Tabelle 4: Auflistung der Grade/Punkte mit dazugehörigem Schweregrad und Verteilungsmuster wie sie im Zuge des HE-Scorings zur Beurteilung der histologischen Veränderungen angewendet wurden .....</i>	35
<i>Tabelle 5: Berücksichtigte EP-typische Läsionen bei der Beurteilung der HE-gefärbten Lungengewebeschnitte .....</i>	36
<i>Tabelle 6: Prädilektionsstellen für ISH-Signale beim intraläsionalen Erregernachweis von M. hyopneumoniae nach KWON und CHAE (1999) .....</i>	36
<i>Tabelle 7: Anzahl Lungen mit Verdickung der Alveolarsepten nach Graden sortiert und mittlerer Grad mit Standardabweichung aller untersuchten Lungen.....</i>	43
<i>Tabelle 8: Anzahl Lungen mit Bronchus-assoziiierter lymphatischer Hyperplasie nach Graden sortiert und mittlerer Grad mit Standardabweichung aller untersuchten Lungen.....</i>	45
<i>Tabelle 9: Anzahl Lungen mit Exsudat in den Alveolen nach Graden sortiert und mittlerer Grad mit Standardabweichung aller untersuchten Lungen.....</i>	46
<i>Tabelle 10: Anzahl Lungen mit peribronchialer und peribronchiolärer Infiltration mit Entzündungszellen nach Graden sortiert und mittlerer Grad mit Standardabweichung aller untersuchten Lungen.....</i>	47
<i>Tabelle 11: Korrelationen zwischen der Erregerlast und den Ergebnissen der In-situ-Hybridisierung (ISH).....</i>	52
<i>Tabelle 12: Kontingenztafel zur Kalkulation der Sensitivität der In-situ-Hybridisierung (n= 27) .....</i>	55



---

<i>Tabelle 13: Befundergebnisse nach Tiernummern (n= 27) sortiert (akzess.= akzessorisch, CT= cycle threshold, HE= Hämalaun Eosin, qPCR= real-time PCR, ISH= In-situ-Hybridisierung) .....</i>	<i>98</i>
<i>Tabelle 14: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben und Gerätetyp nach fortlaufender Nummer sortiert.....</i>	<i>101</i>

## IX. ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 1: Ergebnisse des Lungen-Scorings nach MADEC und KOBISCH (1982) für die 27 Lungengewebeproben mit dazugehörigem Summenscore (1-28 Punkte) .....</i>	<i>40</i>
<i>Abbildung 2: Die Ergebnisse des Scorings der Lungenläsionen im Zuge der Schlachttierkörperuntersuchung aufgeteilt nach Lungenlappen und Grad der Läsionen zusammen mit der Anzahl der Grade und der Anzahl veränderter Lungenlappen (SL= Spitzenlappen, ML= Mittellappen, HL= Hauptlappen, ALL= akzessorischer Lungenlappen, re= rechts, li= links) 42</i>	
<i>Abbildung 3: Verteilung Grade (1-6) der im HE-Scoring untersuchten histologischen Veränderungen der 27 Lungengewebeproben.....</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung der Verdickung der Alveolarsepten von unauffällig (A), geringgradig (B), mittelgradig (C) bis hochgradig (D). Skala entspricht 200µm, Hämalaun-Eosin, Quelle: Eigene Aufnahme .....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung der BAL-T-(bronchus-associated lymphoid tissue) Ausprägungsgrade von unauffällig (A), geringgradig (B), mittelgradig (C) bis hochgradig (D). Skala entspricht 200µm, Hämalaun-Eosin, Quelle: Eigene Aufnahme .....</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung der Füllung der Alveolen mit Exsudat und Ödemflüssigkeit von unauffällig (A), geringgradig (B), mittelgradig (C) bis hochgradig (D). Skala entspricht 200µm, Hämalaun-Eosin, Quelle: Eigene Aufnahme .....</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 7: A bis C: Beispielhafte Darstellung der Zellinfiltration der Lamina propria eines Bronchus von geringgradig (A), mittelgradig (B) bis hochgradig (C). Skala entspricht 100µm, Hämalaun-Eosin. D: Übersichtsaufnahme einer hochgradigen Entzündungszellinfiltration der Lamina propria eines Bronchiolus mit angebildetem BAL-T. Skala entspricht 300µm, Hämalaun-Eosin. Quelle: Eigene Aufnahme.....</i>	<i>47</i>
<i>Abbildung 8: Beispielhafte Darstellung eines Bronchiolus mit geringgradig positivem Signal auf dem Bronchiolusepithel. Skala entspricht 100µm, In-situ-Hybridisierung. Quelle: Eigene Aufnahme.....</i>	<i>48</i>

<i>Abbildung 9: Beispielhafte Darstellung eines Bronchus mit mittelgradig positivem Signal auf dem Bronchialepithel. Skala entspricht 100µm, In-situ-Hybridisierung. Quelle: Eigene Aufnahme.....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 10: Beispielhafte Darstellung eines Bronchus mit hochgradig positivem Signal auf dem Bronchialepithel. Skala entspricht 100µm, In-situ-Hybridisierung. Quelle: Eigene Aufnahme.....</i>	<i>49</i>
<i>Abbildung 11: Prozentuale Verteilung der ISH-Signale in den Lungengewebeproben: Grade negativ bis hochgradig in den jeweiligen Lokalisationen (AlveoMak= Alveolarmakrophagen) .....</i>	<i>50</i>
<i>Abbildung 12: Lungengewebeproben (1-27) mit dem Summenscore der ISH sortiert nach aufsteigender Erregerlast (Erreger/µg DNA).....</i>	<i>52</i>
<i>Abbildung 13: Boxplots der Erregerlasten der Lungengewebeproben aus der qPCR gruppiert nach Graden (0-3) der Signalstärken auf dem Bronchialepithel (<sup>a</sup>: markiert signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen).....</i>	<i>54</i>

## **X. LITERATURVERZEICHNIS**

Adams C, Pitzer J, Minion FC. In vivo expression analysis of the P97 and P102 paralog families of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Infection and Immunity* 2005; 73: 7784-7787.

Amann RI, Ludwig W, Schleifer K-H. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews* 1995; 59: 143-169.

Amass SF, Clark LK, van Alstine WG, Bowersock TL, Murphy DA, Knox KE, Albregts SR. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Pasteurella multocida* infections in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1994; 204: 102-107.

Ameri M, Zhou E-M, Hsu WH. Western blot immunoassay as a confirmatory test for the presence of anti-*Mycoplasma hyopneumoniae* antibodies in swine serum. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2006; 18: 198-201.

Andreasen M, Nielsen JP, Bækbo P, Willeberg P, Bøtner A. A longitudinal study of serological patterns of respiratory infections in nine infected Danish swine herds. *Preventive Veterinary Medicine* 2000; 45: 221-235.

Artiushin S, Stipkovits L, Minion FC. Development of polymerase chain reaction primers to detect *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Molecular and Cellular Probes* 1993; 7: 381-385.

Asai T, Okada M, Yokomizo Y, Sato S, Mori Y. Suppressive effect of bronchoalveolar lavage fluid from pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* on chemiluminescence of porcine peripheral neutrophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1996; 51: 325-331.

Baccaro MR, Hirose F, Umehara O, Gonçalves LC, Doto DS, Paixão R, Shinya LT, Moreno AM. Comparative efficacy of two single-dose bacterins in the control of *Mycoplasma hyopneumoniae* in swine raised under commercial conditions in Brazil. *The Veterinary Journal* 2006; 172: 526-531.

Bargen LE. A system response to an outbreak of enzootic pneumonia in grow/finish pigs. *The Canadian Veterinary Journal* 2004; 45: 856-859.

Beffort L, Weiß C, Fiebig K, Jolie R, Ritzmann M, Eddicks M. Field study on the safety and efficacy of intradermal versus intramuscular vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Record* 2017; 181: 348-348.

Blanchard B, Vena MM, Cavalier A, Le Lannic J, Gouranton J, Kobisch M. Electron microscopic observation of the respiratory tract of SPF piglets inoculated with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 1992; 30: 329-341.

Blanchard B, Kobisch M, Bové JM, Saillard C. Polymerase chain reaction for *Mycoplasma hyopneumoniae* detection in tracheobronchiolar washings from pigs. *Molecular and Cellular Probes* 1996; 10: 15-22.

Bochev I. Porcine respiratory disease complex (PRDC): A review. I. Etiology, epidemiology, clinical forms and pathoanatomical features. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine* 2007; 10: 131-146.

Boye M, Jensen TK, Ahrens P, Hagedorn-Olsen T, Friis NF. In situ hybridisation for identification and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae*, *Mycoplasma hyosynoviae* and *Mycoplasma hyorhinis* in formalin-fixed porcine tissue sections. *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica* 2001; 109: 656-664.

Cai HY, van Dreumel T, McEwen B, Hornby G, Bell-Rogers P, McRaid P, Josephson G, Maxie G. Application and field validation of a PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* from swine lung tissue samples. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 2007; 19: 91-95.

Calsamiglia M, Pijoan C, Trigo A. Application of a nested polymerase chain reaction assay to detect *Mycoplasma hyopneumoniae* from nasal swabs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 1999; 11: 246-251.

Calsamiglia M, Collins JE, Pijoan C. Correlation between the presence of enzootic pneumonia lesions and detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in bronchial swabs by PCR. *Veterinary Microbiology* 2000; 76: 299-303.

Calsamiglia M, Pijoan C. Colonisation state and colostral immunity to *Mycoplasma hyopneumoniae* of different parity sows. *Veterinary Record* 2000; 146: 530-532.

Cardona AC, Pijoan C, Dee SA. Assessing *Mycoplasma hyopneumoniae* aerosol movement at several distances. *Veterinary Record* 2005; 156: 91-92.

Caron J, Ouadani M, Dea S. Diagnosis and differentiation of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Mycoplasma hyorhinis* infections in pigs by PCR amplification of the p36 and p46 genes. *Journal of Clinical Microbiology* 2000; 38: 1390-1396.

Caruso JP, Ross RF. Effects of *Mycoplasma hyopneumoniae* and *Actinobacillus* (*Haemophilus*) *pleuropneumoniae* infections on alveolar macrophage functions in swine. *American Journal of Veterinary Research* 1990; 51: 227-231.

Caswell JL, Williams KJ. Respiratory System. In: *Pathology of Domestic Animals*, 6 edn. Maxie MG, ed. St. Louis, Missouri: Elsevier 2016: 465-591.

Cheikh Saad Bouh K, Shareck F, Dea S. Monoclonal antibodies to Escherichia coli-expressed p46 and p65 membranous proteins for specific immunodetection of Mycoplasma hyopneumoniae in lungs of infected pigs. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology 2003; 10: 459-468.

Choi C, Kwon D, Jung K, Ha Y, Lee Y-H, Kim O, Park H-K, Kim S-H, Hwang K-K, Chae C. Expression of inflammatory cytokines in pigs experimentally infected with Mycoplasma hyopneumoniae. Journal of Comparative Pathology 2006; 134: 40-46.

Christensen G, Sorensen V, Mousing J. Diseases of the respiratory system. In: Diseases of Swine, 8 edn. Straw B, D'Allaire S, Mengeling W, Taylor D, eds. USA: Iowa State University Press 1999: 913-940.

Ciprian A, Pijoan C, Cruz T, Camacho J, Tortora J, Colmenares G, Lopez-Revilla R, de la Garza M. Mycoplasma hyopneumoniae increases the susceptibility of pigs to experimental Pasteurella multocida pneumonia. Canadian Journal of Veterinarian Research 1988; 52: 434-438.

Deblanc C, Gorin S, Quéguiner S, Gautier-Bouchardon AV, Ferré S, Amenna N, Cariolet R, Simon G. Pre-infection of pigs with Mycoplasma hyopneumoniae modifies outcomes of infection with European swine influenza virus of H1N1, but not H1N2, subtype. Veterinary Microbiology 2012; 157: 96-105.

Deffner PSS. Vorkommen von Infektionen mit Mycoplasma hyopneumoniae im Saugferkelalter und deren Weiterverbreitung in nachgelagerten Produktionsstufen. Diss. med. vet. 2020. Ludwig-Maximilians-Universität München.

Djordjevic SP, Eamens GJ, Romalis LF, Nicholls PJ, Taylor V, Chin J. Serum and mucosal antibody responses and protection in pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with vaccines containing a denatured membrane antigen pool and adjuvant. *Australien Veterinary Journal* 1997; 75: 504-511.

Djordjevic SP, Cordwell SJ, Djordjevic MA, Wilton J, Minion FC. Proteolytic processing of the *Mycoplasma hyopneumoniae* cilium adhesin. *Infection and Immunity* 2004; 72: 2791-2802.

Dottori M, Nigrelli AD, Bonilauri P, Merialdi G, Gozio S, Cominotti F. Proposal for a new grading system for pleuritis at slaughterhouse. The SPES (slaughterhouse pleuritis evaluation system) grid. *Large Animal Review* 2007; 13: 161-165.

Dubosson CR, Conzelmann C, Miserez R, Boerlin P, Frey J, Zimmermann W, Häni H, Kuhnert P. Development of two real-time PCR assays for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in clinical samples. *Veterinary Microbiology* 2004; 102: 55-65.

Edward DGf, Freundt EA. The classification and nomenclature of organisms of the pleuropneumonia group. *The Journal of General Microbiology* 1956; 14: 197-207.

Erlandson KR, Evans RB, Thacker BJ, Wegner MW, Thacker EL. Evaluation of three serum antibody enzyme-linked immunosorbent assays for *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production* 2005; 13: 198-203.

Falkenau A. Histologische und immunhistochemische Untersuchungen tertiärer lymphatischer Gewebe in der Lunge des Schweines. Diss. med. vet. 2015. Ludwig-Maximilians-Universität München.



Fano E, Pijoan C, Dee S. Dynamics and persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2005; 69: 223-228.

Fano E, Pijoan C, Dee S, Deen J. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* colonization at weaning on disease severity in growing pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2007; 71: 195-200.

Friis NF. Some recommendations concerning primary isolation of *Mycoplasma suipneumoniae* and *Mycoplasma flocculare* a survey. *Nordisk Veterinärmedicin* 1975; 27: 337-339.

Futo S, Seto Y, Mitsuse S, Mori Y. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by using rRNA-oligodeoxynucleotide hybridization. *Journal of Clinical Microbiology* 1992; 30: 1509-1513.

Garcia-Morante B, Segalés J, Fraile L, de Rozas AP, Maiti H, Coll T, Sibila M. Assessment of *Mycoplasma hyopneumoniae*-induced pneumonia using different lung lesion scoring systems: a comparative review. *Journal of Comparative Pathology* 2016; 154: 125-134.

Geldermann H, Seyfert H-M. Vermehrung von DNA-Molekülen durch Polymerasekettenreaktion (PCR). In: *Tier-Biotechnologie*. Geldermann H, ed. Stuttgart: Ulmer 2005: 117-132.

Geldermann H. Genomkartierung. In: *Tier-Biotechnologie*. Geldermann H, ed. Stuttgart: Ulmer 2005: 269-310.

grosse Beilage E, Rohde N, Krieter J. Seroprevalence and risk factors associated with seropositivity in sows from 67 herds in north-west Germany infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Preventive Veterinary Medicine* 2009; 88: 255-263.

grosse Beilage E, Nathues H, Grummer B, Hartung J, Kamphues J, Kietzmann M, Rohde J, Spindler B, Weissenböck H. Diagnostik, Prophylaxe und Therapie von Atemwegserkrankungen in Schweinebeständen. In: Diagnostik und Gesundheitsmanagement im Schweinebestand, 1 edn. Grosse Beilage E, Wendt M, eds. Stuttgart: Eugen Ulmer KG 2013: 200-270.

Harasawa R, Koshimizu K, Takeda O, Uemori T, Asada K, Kato I. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes* 1991; 5: 103-109.

Harley S, More S, Boyle L, O'Connell N, Hanlon A. Good animal welfare makes economic sense: potential of pig abattoir meat inspection as a welfare surveillance tool. *Irish Veterinary Journal* 2012; 65: 11.

Heinonen M, Laurila T, Vidgren G, Levonen K. Eradication of *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine finishing herd without total depopulation. *The Veterinary Journal* 2011; 188: 110-114.

Hillen S, von Berg S, Köhler K, Reinacher M, Willems H, Reiner G. Occurrence and severity of lung lesions in slaughter pigs vaccinated against *Mycoplasma hyopneumoniae* with different strategies. *Preventive Veterinary Medicine* 2014; 113: 580-588.

Holst S, Yeske P, Pieters M. Elimination of *Mycoplasma hyopneumoniae* from breed-to-wean farms: a review of current protocols with emphasis on herd closure and medication. *Journal of Swine Health and Production* 2015; 23: 321-330.

Huang YT, Chu RM, Liu RS, Weng CN. Morphologic studies of intrapulmonary airway mucosa-associated lymphoid tissues in swine. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1990; 25: 13-22.

Intervet International. IDAL – nadellos intradermal impfen – Modernste Technologie. 2021: <https://www.msd-tiergesundheits.de/fokusthemen/idal/>. 17.02.2021.

Jacobs E. Mykoplasmen und Ureaplasmen. In: Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Sauerbaum S, Burchard G-D, Kaufmann SHE, Schulz TF, eds. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag 2016: 399-403.

Jacques M, Blanchard B, Foiry B, Girard C, Kobisch M. In vitro colonization of porcine trachea by *Mycoplasma hyopneumoniae*. Annales de Recherches Veterinaires 1992; 23: 239-247.

Jericho KWF. Intrapulmonary lymphoid tissue of healthy pigs. Research in Veterinary Science 1970; 11: 548-554.

Jorsal SE, Thomsen BL. A Cox regression analysis of risk factors related to *Mycoplasma suis* pneumoniae reinfection in Danish SPF-herds. Acta Veterinaria Scandinavica 1988; 84: 436-438.

Kobisch M, Blanchard B, Le Potier M. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and resistance to reinfection. Veterinary Research 1993; 24: 67-77.

Komminoth P. Digoxigenin as an alternative probe labeling for in situ hybridization. Diagnostic Molecular Pathology 1992; 1: 142-150.

König HE, Liebich H-G. Atmungsapparat. In: Anatomie der Haustiere. König HE, Liebich H-G, eds. Stuttgart: Thieme 2018: 395-416.

Kurth KT, Hsu T, Snook ER, Thacker EL, Thacker BJ, Minion FC. Use of a *Mycoplasma hyopneumoniae* nested polymerase chain reaction test to determine the optimal sampling sites in swine. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 2002; 14: 463-469.

Kwon D, Chae C. Detection and localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA in lungs from naturally infected pigs by in situ hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *Veterinary Pathology* 1999; 36: 308-313.

Kwon D, Choi C, Chae C. Chronologic localization of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs. *Veterinary Pathology* 2002; 39: 584-587.

Le Carrou J, Laurentie M, Kobisch M, Gautier-Bouchardon AV. Persistence of *Mycoplasma hyopneumoniae* in experimentally infected pigs after marbofloxacin treatment and detection of mutations in the *parC* gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50: 1959-1966.

Le Grand A, Kobisch M. Comparison of the use of a vaccine and sequential antibiotic treatment in a herd infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Research* 1996; 27: 241-253.

Liebich H-G, Zengerling G. Atmungsapparat (Apparatus respiratorius). In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel. Liebich H-G, ed. Stuttgart: Schattauer GmbH 2010: 255-274.

Lin JH, Chen SP, Yeh KS, Weng CN. *Mycoplasma hyorhinis* in Taiwan: diagnosis and isolation of swine pneumonia pathogen. *Veterinary Microbiology* 2006; 115: 111-116.

Livingston CW, Stair EL, Underdahl NR, Mebus CA. Pathogenesis of mycoplasmal pneumonia in swine. *American Journal of Veterinary Research* 1972; 33: 2249-2258.

Lorenzo H, Quesada Ó, Assunção P, Castro A, Rodríguez F. Cytokine expression in porcine lungs experimentally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2006; 109: 199-207.

Madec F, Kobisch M. Bilan lésionnel des poumons de porcs charcutiers à l'abattoir. Journées de la Recherche Porcine 1982; 14: 405-412.

Maes D, Verdonck M, Deluyker H, de Kruif A. Enzootic pneumonia in pigs. Veterinary Quarterly 1996; 18: 104-109.

Maes D, Deluyker H, Verdonck M, Castryck F, Miry C, Lein A, Vrijens B, de Kruif A. The effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with a continuous production system. Journal of Veterinary Medicine, Series B 1998; 45: 495-505.

Maes D, Deluyker H, Verdonck M, Castryck F, Miry C, Vrijens B, Verbeke W, Viaene J, de Kruif A. Effect of vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig herds with an all-in/all-out production system. Vaccine 1999; 17: 1024-1034.

Maes D, Segales J, Meyns T, Sibila M, Pieters M, Haesebrouck F. Control of *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs. Veterinary Microbiology 2008; 126: 297-309.

Maes D, Sibila M, Kuhnert P, Segalés J, Haesebrouck F, Pieters M. Update on *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in pigs: knowledge gaps for improved disease control. Transboundary and Emerging Diseases 2018; 65: 110-124.

Marchioro SB, Maes D, Flahou B, Pasmans F, Del Pozo Sacristán R, Vranckx K, Melkebeek V, Cox E, Wuyts N, Haesebrouck F. Local and systemic immune responses in pigs intramuscularly injected with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine. Vaccine 2013; 31: 1305-1311.

Marois C, Le Carrou J, Kobisch M, Gautier-Bouchardon AV. Isolation of *Mycoplasma hyopneumoniae* from different sampling sites in experimentally infected and contact SPF piglets. *Veterinary Microbiology* 2007; 120: 96-104.

Marois C, Gottschalk M, Morvan H, Fablet C, Madec F, Kobisch M. Experimental infection of SPF pigs with *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 9 alone or in association with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Microbiology* 2009; 135: 283-291.

Marois C, Dory D, Fablet C, Madec F, Kobisch M. Development of a quantitative real-time TaqMan PCR assay for determination of the minimal dose of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 116 required to induce pneumonia in SPF pigs. *Journal of Applied Microbiology* 2010; 108: 1523-1533.

Martelli P, Terreni M, Guazzetti S, Cavarani S. Antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in vaccinated pigs with or without maternal antibodies induced by sow vaccination. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 2006; 53: 229-233.

Mattsson JG, Bergström K, Wallgren P, Johansson K-E. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nose swabs from pigs by in vitro amplification of the 16S rRNA gene. *Journal of Clinical Microbiology* 1995; 33: 893-897.

Mayor D, Zeeh F, Frey J, Kuhnert P. Diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pig farms revealed by direct molecular typing of clinical material. *Veterinary Research* 2007; 38: 391-398.

Meyns T, Maes D, Dewulf J, Vicca J, Haesebrouck F, de Kruif A. Quantification of the spread of *Mycoplasma hyopneumoniae* in nursery pigs using transmission experiments. *Preventive Veterinary Medicine* 2004; 66: 265-275.

Meyns T, Dewulf J, De Kruif A, Calus D, Haesebrouck F, Maes D. Comparison of transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in vaccinated and non-vaccinated populations. *Vaccine* 2006; 24: 7081-7086.

Meyns T, Maes D, Calus D, Ribbens S, Dewulf J, Chiers K, de Kruif A, Cox E, Decostere A, Haesebrouck F. Interactions of highly and low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolates with the respiratory tract of pigs. *Veterinary Microbiology* 2007; 120: 87-95.

Minion FC, Lefkowitz EJ, Madsen ML, Cleary BJ, Swartzell SM, Mahairas GG. The genome sequence of *Mycoplasma hyopneumoniae* strain 232, the agent of swine mycoplasmosis. *Journal of Bacteriology* 2004; 186: 7123-7133.

Morris CR, Gardner IA, Hietala SK, Carpenter TE, Anderson RJ, Parker KM. Seroepidemiologic study of natural transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in a swine herd. *Preventive Veterinary Medicine* 1995a; 21: 323-337.

Morris CR, Gardner IA, Hietala SK, Carpenter TE. Enzootic pneumonia: comparison of cough and lung lesions as predictors of weight gain in swine. *Canadian Journal of Veterinarian Research* 1995b; 59: 197-204.

Nathues H, Spargser J, Rosengarten R, Kreienbrock L, grosse Beilage E. Value of the clinical examination in diagnosing enzootic pneumonia in fattening pigs. *The Veterinary Journal* 2012; 193: 443-447.

Nathues H, Woeste H, Doebering S, Fahrion AS, Doherr MG, grosse Beilage E. Herd specific risk factors for *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in suckling pigs at the age of weaning. *Acta Veterinaria Scandinavica* 2013; 55: 1-13.

Nathues H, Chang YM, Wieland B, Rechter G, Spargser J, Rosengarten R, Kreienbrock L, Grosse Beilage E. Herd-level risk factors for the seropositivity to *Mycoplasma hyopneumoniae* and the occurrence of Enzootic Pneumonia among fattening pigs in areas of endemic infection and high pig density. *Transboundary and Emerging Diseases* 2014; 61: 316-328.

Noyes EP, Feeney DA, Pijoan C. Comparison of the effect of pneumonia detected during lifetime with pneumonia detected at slaughter on growth in swine. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1990; 197: 1025-1029.

Opriessnig T, Thacker EL, Yu S, Fenaux M, Meng X-J, Halbur PG. Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with *Mycoplasma hyopneumoniae* and porcine circovirus type 2. *Veterinary Pathology* 2004; 41: 624-640.

Otake S, Dee S, Corzo C, Oliveira S, Deen J. Long-distance airborne transport of infectious PRRSV and *Mycoplasma hyopneumoniae* from a swine population infected with multiple viral variants. *Veterinary Microbiology* 2010; 145: 198-208.

Pabst R, Gehrke I. Is the bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) an integral structure of the lung in normal mammals, including humans? *American Journal of Respiratory Cell Molecular Biology* 1990; 3: 131-135.

Pereira CER, Vannucci FA, Gabardo MdP, dos Santos LF, Mores N, Guedes R. *Mycoplasma hyorhinis* infection in early cases of mycoplasmal pneumonia in swine and evaluation of diagnostic assays. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 2017; 37: 1057-1063.

Petersen AC, Oneal DC, Seibel JR, Poel K, Daum CL, Djordjevic SP, Minion FC. Cross reactivity among the swine mycoplasmas as identified by protein microarray. *Veterinary Microbiology* 2016; 192: 204-212.



Pieters M, Pijoan C, Fano E, Dee S. An assessment of the duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in an experimentally infected population of pigs. *Veterinary Microbiology* 2009; 134: 261-266.

Pieters M, Fano E, Pijoan C, Dee S. An experimental model to evaluate *Mycoplasma hyopneumoniae* transmission from asymptomatic carriers to unvaccinated and vaccinated sentinel pigs. *Canadian Journal of Veterinarian Research* 2010; 74: 157-160.

Pieters M, Fano E. *Mycoplasma hyopneumoniae* management in gilts. *Veterinary Record* 2016; 178: 122-123.

Pieters M, Daniels J, Rovira A. Comparison of sample types and diagnostic methods for in vivo detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* during early stages of infection. *Veterinary Microbiology* 2017; 203: 103-109.

Pieters M, Maes D. Mycoplasmosis. In: *Diseases of Swine*, 11 edn. Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, Zhang J, eds. USA: John Wiley & Sons 2019: 863-883.

Rawal G, Arruda P, Rademacher C, Bi R, Linhares DCL. General overview of the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* DNA by quantitative polymerase chain reaction in diagnostic cases submitted to the Iowa State University Veterinary Diagnostic Laboratory from 2004 to 2016. *Journal of Swine Health and Production* 2018; 26: 309-315.

Raymond BBA, Turnbull L, Jenkins C, Madhkoor R, Schleicher I, Uphoff CC, Whitchurch CB, Rohde M, Djordjevic S. *Mycoplasma hyopneumoniae* resides intracellularly within porcine epithelial cells. *Scientific Reports* 2018; 8: 1-13.

Razin S. Molecular biology and genetics of mycoplasmas (Mollicutes). *Microbiological Reviews* 1985; 49: 419-455.

Redondo E, Masot AJ, Fernandez A, Gazquez A. Histopathological and immunohistochemical findings in the lungs of pigs infected experimentally with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology* 2009; 140: 260-270.

Reiner G. Erkrankungen des Respirationstraktes. In: *Krankes Schwein*, 1 edn. Reiner G, ed. Stuttgart: Eugen Ulmer KG 2015: 110-127.

Rodriguez F, Ramirez GA, Sarradell J, Andrada M, Lorenzo H. Immunohistochemical labelling of cytokines in lung lesions of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology* 2004; 130: 306-312.

Rodríguez F, Batista M, Hernández JN, Afonso AM, Poveda JB. Relationship between expression of interleukin-5 and interleukin-13 by epithelial cells and bronchiolar changes in pigs infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Comparative Pathology* 2016; 154: 165-168.

Roos LR, Fano E, Homwong N, Payne B, Pieters M. A model to investigate the optimal seeder-to-naïve ratio for successful natural *Mycoplasma hyopneumoniae* gilt exposure prior to entering the breeding herd. *Veterinary Microbiology* 2016; 184: 51-58.

Ruiz AR, Utrera V, Pijoan C. Effect of *Mycoplasma hyopneumoniae* sow vaccination on piglet colonization at weaning. *Journal of Swine Health and Production* 2003; 11: 131-135.

Sarradell J, Andrada M, Ramirez AS, Fernández A, Gómez-Villamandos JC, Jover A, Lorenzo H, Herraiz P, Rodriguez F. A morphologic and immunohistochemical study of the bronchus-associated lymphoid tissue of pigs naturally infected with *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Veterinary Pathology* 2003; 40: 395-404.

Selbitz H-J. Zellwandlose Bakterien der Klasse Mollicutes. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 10 edn. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2015: 315-324.

Seymour LM, Jenkins C, Deutscher AT, Raymond BBA, Padula MP, Tacchi JL, Bogema DR, Eamens GJ, Woolley LK, Dixon NE. Mhp182 (P102) binds fibronectin and contributes to the recruitment of plasmin (ogen) to the *Mycoplasma hyopneumoniae* cell surface. *Cellular Microbiology* 2012; 14: 81-94.

Sheldrake RF, Gardner IA, Saunders MM, Romalis LF. Serum antibody response to *Mycoplasma hyopneumoniae* measured by enzyme-linked immunosorbent assay after experimental and natural infection of pigs. *Australien Veterinary Journal* 1990; 67: 39-42.

Sibila M, Calsamiglia M, Vidal D, Badiella L, Aldaz Á, Jensen JC. Dynamics of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in 12 farms with different production systems. *Canadian Journal of Veterinary Research* 2004; 68: 12-18.

Sibila M, Nofrarias M, López-Soria S, Segalés J, Valero O, Espinal A, Calsamiglia M. Chronological study of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection, seroconversion and associated lung lesions in vaccinated and non-vaccinated pigs. *Veterinary Microbiology* 2007; 122: 97-107.

Sibila M, Bernal R, Torrents D, Riera P, Llopart D, Calsamiglia M, Segalés J. Effect of sow vaccination against *Mycoplasma hyopneumoniae* on sow and piglet colonization and seroconversion, and pig lung lesions at slaughter. *Veterinary Microbiology* 2008; 127: 165-170.

Sibila M, Pieters M, Molitor T, Maes D, Haesebrouck F, Segalés J. Current perspectives on the diagnosis and epidemiology of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection. *The Veterinary Journal* 2009; 181: 221-231.

Sibila M, Fort M, Nofrarias M, de Rozas AP, Galindo-Cardiel I, Mateu E, Segalés J. Simultaneous porcine circovirus type 2 and *Mycoplasma hyopneumoniae* co-inoculation does not potentiate disease in conventional pigs. *Journal of Comparative Pathology* 2012; 147: 285-295.

Sibila M, Aragón V, Fraile L, Segalés J. Comparison of four lung scoring systems for the assessment of the pathological outcomes derived from *Actinobacillus pleuropneumoniae* experimental infections. *BMC Veterinary Research* 2014; 10: 165-174.

Sipos W, Dobrokes B, Meppiel L, Sailer J, Friedmann U, Cvjetković V. Die Lungenscore-Befunde von Schlachtschweinen sind mit dem Impfstatus gegen *Mycoplasma hyopneumoniae* und PCV2 assoziiert. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 2020; 133: 1-5.

Sørensen V, Ahrens P, Barfod K, Feenstra AA, Feld NC, Friis NF, Bille-Hansen V, Jensen NE, Pedersen MW. *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in pigs: duration of the disease and evaluation of four diagnostic assays. *Veterinary Microbiology* 1997; 54: 23-34.

Stakenberg T, Vicca J, Butaye P, Maes D, Peeters J, de Kruif A, Haesebrouck F. The diversity of *Mycoplasma hyopneumoniae* within and between herds using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology* 2005; 109: 29-36.

Stärk KDC, Nicolet J, Frey J. Detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* by air sampling with a nested PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology* 1998; 64: 543-548.

Stärk KDC. Epidemiological investigation of the influence of environmental risk factors on respiratory diseases in swine—a literature review. *The Veterinary Journal* 2000; 159: 37-56.

Stärk KDC, Miserez R, Siegmann S, Ochs H, Infanger P, Schmidt J. A successful national control programme for enzootic respiratory diseases in pigs in Switzerland. *Revue Scientifique et Technique* 2007; 26: 595-606.

Strait EL, Madsen ML, Minion FC, Christopher-Hennings J, Dammen M, Jones KR, Thacker EL. Real-time PCR assays to address genetic diversity among strains of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Clinical Microbiology* 2008; 46: 2491-2498.

Tajima M, Yagihashi T. Interaction of *Mycoplasma hyopneumoniae* with the porcine respiratory epithelium as observed by electron microscopy. *Infection and Immunity* 1982; 37: 1162-1169.

Thacker EL, Thacker BJ, Boettcher TB, Jayappa H. Comparison of antibody production, lymphocyte stimulation, and protection induced by four commercial *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterins. *Journal of Swine Health and Production* 1998; 6: 107-112.

Thacker EL, Halbur PG, Ross RF, Thanawongnuwech R, Thacker BJ. *Mycoplasma hyopneumoniae* potentiation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced pneumonia. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37: 620-627.

Thacker EL, Thacker BJ, Kuhn M, Hawkins PA, Waters WR. Evaluation of local and systemic immune responses induced by intramuscular injection of a *Mycoplasma hyopneumoniae* bacterin to pigs. *American Journal of Veterinary Research* 2000; 61: 1384-1389.

Thacker EL, Thacker BJ, Janke BH. Interaction between *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus. *Journal of Clinical Microbiology* 2001; 39: 2525-2530.

Thacker EL. Diagnosis of *Mycoplasma hyopneumoniae*. *Journal of Swine Health and Production* 2004; 12: 252-254.

Tully JG, Bové JM, Laigret F, Whitcomb RF. Revised taxonomy of the class Mollicutes: proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated Mollicutes to ordinal rank (Entomoplasmatales ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (Entomoplasmataceae fam. nov.) from helical species (Spiroplasmataceae), and emended descriptions of the order Mycoplasmatales, family Mycoplasmataceae. *International Journal of Systemic Bacteriology* 1993; 43: 378-385.

Underdahl NR, Kennedy GA, Ramos AS. Duration of *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in gnotobiotic pigs. *The Canadian Veterinary Journal* 1980; 21: 258-261.

Valentin-Weigand P. Allgemeine Bakteriologie, Grundlagen. In: Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, 10 edn. Selbitz H-J, Truyen U, Valentin-Weigand P, eds. Stuttgart: Enke Verlag 2015: 96-122.

Van Alstine WG, Stevenson GW, Kanitz CL. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus does not exacerbate *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in young pigs. *Veterinary Microbiology* 1996; 49: 297-303.

Vangroenweghe FACJ, Labarque GG, Piepers S, Strutzberg-Minder K, Maes D. *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in peri-weaned and post-weaned pigs in Belgium and The Netherlands: Prevalence and associations with climatic conditions. *The Veterinary Journal* 2015; 205: 93-97.

Verdin E, Saillard C, Labbé A, Bove JM, Kobisch M. A nested PCR assay for the detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tracheobronchiolar washings from pigs. *Veterinary Microbiology* 2000; 76: 31-40.

Vicca J, Maes D, Thermote L, Peeters J, Haesebrouck F, de Kruif A. Patterns of *Mycoplasma hyopneumoniae* Infections in Belgian farrow-to-finish pig herds with diverging disease-course. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 2002; 49: 349-353.

Vicca J, Stakenborg T, Maes D, Butaye P, Peeters J, de Kruif A, Haesebrouck F. Evaluation of virulence of *Mycoplasma hyopneumoniae* field isolates. *Veterinary Microbiology* 2003; 97: 177-190.

Villarreal I, Maes D, Meyns T, Gebruers F, Calus D, Pasmans F, Haesebrouck F. Infection with a low virulent *Mycoplasma hyopneumoniae* isolate does not protect piglets against subsequent infection with a highly virulent *M. hyopneumoniae* isolate. *Vaccine* 2009; 27: 1875-1879.

Villarreal I, Vranckx K, Duchateau L, Pasmans F, Haesebrouck F, Jensen JC, Nanjiani IA, Maes D. Early *Mycoplasma hyopneumoniae* infections in European suckling pigs in herds with respiratory problems: detection rate and risk factors. *Veterinari Medicina* 2010; 55: 318-324.

Villarreal I, Meyns T, Dewulf J, Vranckx K, Calus D, Pasmans F, Haesebrouck F, Maes D. The effect of vaccination on the transmission of *Mycoplasma hyopneumoniae* in pigs under field conditions. *The Veterinary Journal* 2011; 188: 48-52.

Weisburg WG, Tully JG, Rose DL, Petzel JP, Oyaizu H, Yang D, Mandelco L, Sechrest J, Lawrence TG, Van Etten J. A phylogenetic analysis of the *Mycoplasmas*: basis for their classification. *Journal of Bacteriology* 1989; 171: 6455-6467.

Welsch U, Kummer W, Deller T (2018) *Histologie*, 5 edn. Elsevier GmbH, München

Wilson S, Van Brussel L, Saunders G, Taylor L, Zimmermann L, Heinritzi K, Ritzmann M, Banholzer E, Eddicks M. Vaccination of piglets at 1 week of age with an inactivated *Mycoplasma hyopneumoniae* vaccine reduces lung lesions and improves average daily gain in body weight. *Vaccine* 2012; 30: 7625-7629.

Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiological Reviews* 1987; 51: 221-271.

Woolley LK, Fell S, Gonsalves JR, Walker MJ, Djordjevic SP, Jenkins C, Eamens GJ. Evaluation of clinical, histological and immunological changes and qPCR detection of *Mycoplasma hyopneumoniae* in tissues during the early stages of mycoplasmal pneumonia in pigs after experimental challenge with two field isolates. *Veterinary Microbiology* 2012; 161: 186-195.

Woolley LK, Fell SA, Gonsalves JR, Raymond BBA, Collins D, Kuit TA, Walker MJ, Djordjevic SP, Eamens GJ, Jenkins C. Evaluation of recombinant *Mycoplasma hyopneumoniae* P97/P102 paralogs formulated with selected adjuvants as vaccines against mycoplasmal pneumonia in pigs. *Vaccine* 2014; 32: 4333-4341.

Young TF, Ross RF. Assessment of antibody response of swine infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* by immunoblotting. *American Journal of Veterinary Research* 1987; 48: 651-656.





## **XI. ANHANG**

### **1. Befunddokumentation**

**Tabelle 13: Befundergebnisse nach Tiernummern (n= 27) sortiert (akzess.= akzessorisch, CT= cycle threshold, HE= Hämalaun Eosin, qPCR= real-time PCR, ISH= In-situ-Hybridisierung)**

Tiernummer	Makroskopie							Molekularbiologie		Histologie												
	Lokalisation/Grad (0-4 )							qPCR		HE-Scoring					ISH-Scoring							
										Lokalisation/Grad (0-6)					Lokalisation/Grad (0-3)							
Spitzenlappen rechts	Mittellappen rechts	Zwerchfelllappen rechts	akzess. Lungenlappen	Zwerchfelllappen links	Mittellappen links	Spitzenlappen links	Summenscore (0-24)	CT-Werte	Erreger/µg DNA gesamt	Alveolarsepten	BALT-Hyperplasie	Exsudat in Alveolen	Infiltration mit Entzündungszellen	Summenscore (0-24)	Interstitium	Bronchusepithel	Bronchiolusepithel	Alveolarmakrophagen	Pneumozyten	Gesamtsignalmenge (0-3)	Summenscore (0-15)	
1	0	0	0	0	0	1	0	1	27,00	6,20E+04	5	5	1	5	16	1	2	1	1	0	2	5
2	0	2	0	0	0	2	1	5	25,27	1,92E+05	3	2	1	3	9	0	0	1	1	0	1	2
3	1	4	0	2	1	4	2	14	26,41	8,62E+04	5	5	6	6	22	0	2	2	1	0	2	5
4	0	0	0	0	0	2	1	3	30,16	6,82E+03	5	6	1	4	16	0	0	0	0	0	0	0
5	0	3	0	0	0	3	1	7	26,09	1,09E+05	6	3	2	6	17	0	1	0	1	0	1	2
6	0	1	1	1	0	2	1	6	25,09	2,09E+05	5	3	1	6	15	1	3	3	3	0	3	10
7	0	0	0	0	0	4	0	4	23,20	8,21E+05	6	6	5	6	23	1	3	2	1	0	3	7
8	0	2	0	0	0	2	0	4	27,88	3,31E+04	5	6	1	4	16	0	1	1	0	0	1	2
9	0	1	0	1	0	2	1	5	25,25	1,94E+05	5	6	1	6	18	0	1	2	0	0	2	3

Tiernummer	Makroskopie							Molekularbiologie		Histologie												
	Lokalisation/Grad (0-4 )							qPCR	HE-Scoring					ISH-Scoring								
									Lokalisation/Grad (0-6)					Lokalisation/Grad (0-3)								
Spitzenlappen rechts	Mittellappen rechts	Zwerchfelllappen rechts	akzess. Lungenlappen	Zwerchfelllappen links	Mittellappen links	Spitzenlappen links	Summenscore (0-24)	CT-Werte	Erreger/ $\mu$ g DNA gesamt	Alveolarsepten	BALT-Hyperplasie	Exsudat in Alveolen	Infiltration mit Entzündungszellen	Summenscore (0-24)	Interstitialium	Bronchusepithel	Bronchiolusepithel	Alveolarmakrophagen	Pneumozyten	Gesamtsignalmenge (0-3)	Summenscore (0-15)	
10	0	0	0	0	0	2	0	2	26,04	1,09E+05	5	5	1	5	16	0	2	1	1	0	2	4
11	0	1	0	1	1	3	1	7	23,21	8,13E+05	4	4	1	3	12	0	2	3	2	0	3	7
12	3	4	1	4	1	4	3	20	28,62	2,07E+04	6	3	5	6	20	0	0	0	0	0	0	0
13	0	1	0	4	0	3	1	9	26,58	8,19E+04	5	6	1	5	17	1	1	1	1	0	1	4
14	0	0	1	1	0	2	0	4	28,54	2,08E+04	4	4	5	4	17	0	1	0	0	0	1	1
15	1	4	0	2	1	0	1	9	28,34	2,50E+04	3	3	1	5	12	1	2	1	0	0	2	4
16	0	1	0	1	0	2	1	5	30,45	5,41E+03	3	3	1	5	12	0	0	0	0	0	0	0
17	1	2	0	0	0	3	1	7	26,23	1,09E+05	3	6	1	5	15	0	3	3	0	0	3	6
18	0	0	0	0	0	3	0	3	26,40	8,36E+04	3	6	1	6	16	0	0	1	0	0	1	1
19	0	1	1	2	2	3	1	10	25,88	1,31E+05	6	4	3	5	18	1	0	0	0	0	0	1
20	0	3	1	4	1	3	2	14	27,52	4,13E+04	6	6	5	6	23	0	0	1	0	0	0	1
21	0	0	0	0	0	2	0	2	26,48	8,61E+04	6	5	3	6	20	0	2	2	0	0	2	4

Tiernummer	Makroskopie							Molekularbiologie		Histologie												
	Lokalisation/Grad (0-4 )							qPCR		HE-Scoring			ISH-Scoring									
										Lokalisation/Grad (0-6)			Lokalisation/Grad (0-3)									
Spitzenlappen rechts	Mittellappen rechts	Zwerchfelllappen rechts	akzess. Lungenlappen	Zwerchfelllappen links	Mittellappen links	Spitzenlappen links	Summenscore (0-24)	CT-Werte	Erreger/ $\mu$ g DNA gesamt	Alveolarsepten	BALT-Hyperplasie	Exsudat in Alveolen	Infiltration mit Entzündungszellen	Summenscore (0-24)	Interstitium	Bronchusepithel	Bronchiolusepithel	Alveolarmakrophagen	Pneumozyten	Gesamtsignalmenge (0-3)	Summenscore (0-15)	
22	0	1	0	0	1	2	0	4	27,93	3,22E+04	5	6	5	5	21	0	0	0	0	0	0	0
23	0	1	0	0	0	1	0	2	27,43	4,18E+04	3	1	3	4	11	0	0	1	0	0	1	1
24	1	2	1	2	1	4	2	13	28,06	2,86E+04	6	3	3	6	18	0	1	2	1	0	2	4
25	1	2	0	1	0	3	1	8	30,33	5,79E+03	4	4	1	5	14	1	0	3	2	0	3	6
26	2	3	1	2	1	3	2	14	26,42	8,63E+04	6	2	4	6	18	0	1	1	0	0	1	2
27	0	4	0	3	1	3	1	12	26,97	6,12E+04	5	6	3	5	19	0	0	1	1	0	1	2

## 2. Geräte

**Tabelle 14: Verwendete Geräte mit Herstellerangaben und Gerätetyp nach fortlaufender Nummer sortiert**

Gerät <sup>x</sup>	Gerät	Hersteller	Gerätetyp
1	Kühlplatte	Medite, Burgdorf	COP30.010
2	Rotationsmikrotom	Microm, Walldorf	Microm HM315
3	Streckbad	CellPath, Newtown, Powys (Großbritannien)	
4	Trockenschrank	Memmert, Schwabach	UN30
5	Autoklav	Systec, Lindau	DX-45
6	Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel	1003
7	Eismaschine	Scotaman Ice, Milano (Italien)	AF 80 AS
8	Vortexer	IKA, Staufen	MS2
9	Magnetrührer	Heidolph, Schwabach	MR 3001 K
10	Filter	Macherey-Nagel, Düren	MN615
11	Filtereinheit	Millipore, Billerica (USA)	0,22µm, 250ml
12	Mikrowelle	LG Electronics Eschborn	MG-3837C

## 3. Verwendete Gebrauchslösungen

### 3.1. 70%iges Ethanol

7000ml 96%iges Ethanol (SAV Liquid Production, Flintsbach am Inn, Nr. ETO-300000-96-1) mit 2600ml Aqua dest. mischen.

### 3.2. 1%ige HCl-Ethanol Stammlösung

7000ml 96%iges Ethanol, 2500ml Aqua dest. und 25%ige Salzsäure (Carl Roth, Karlsruhe, Nr. X897.1) vermischen.

**3.3. 0,5%ige HCl-Ethanol Gebrauchslösung**

100ml 1%ige HCl-Ethanol Stammlösung (XI.3.2) mit 100ml Ethanol 70% (XI.3.1) vermischen.

**3.4. 1%ige Eosin Lösung**

10g Eosin (Merck, Darmstadt, Nr. 1.15935) in 1000ml erhitztem Aqua dest. lösen und 1,5ml Eisessig (AppliChem, Darmstadt, Nr. A3701) hinzugeben. Abschließend filtrieren.

**3.5. TrisHCl (1M) Pufferlösung**

121g Tris Hydrochlorid (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid, Carl Roth, Karlsruhe, Nr. 4855.2) in 800ml DEPC-Wasser Gebrauchslösung (XI.3.7) lösen und mit Salzsäure (AppliChem, Darmstadt, Nr. 143378.1212) den gewünschten pH einstellen, autoklavieren<sup>5</sup>.

**3.6. TrisHCl (0,5M) pH 7,6 Gebrauchslösung**

Herstellung wie TrisHCl (1M) Pufferlösung (XI.3.5) jedoch nur 60,5g Tris Hydrochlorid verwenden. Anschließend mit Salzsäure auf pH 7,6 einstellen, autoklavieren<sup>5</sup>.

**3.7. DEPC-Wasser Gebrauchslösung 0,1%ig**

1000ml Aqua dest. mit 1ml DEPC (Diethylpyrocarbonat, AppliChem, Darmstadt, Nr A0881) durch schütteln vermischen. Über Nacht stehen lassen, autoklavieren<sup>5</sup>.

**3.8. Hybridisierungslösung 1**

Angegebenes Mengenverhältnis gilt für 500µl Gebrauchslösung aus Hybridisierungslösung 1 und 2 (XI.3.10).

25µl Heringsperma-DNA Gebrauchslösung (XI.3.11), 35µl Formamid Gebrauchslösung (XI.3.12) und 10µl *M. hyopneumoniae* Gebrauchslösung (XI.3.13) vermischen. Anschließend bei 95°C ins Wasserbad<sup>6</sup> stellen, 5 Minuten. Danach auf Eis<sup>7</sup> kühlstellen.

**3.9. Hybridisierungslösung 2**

Angegebenes Mengenverhältnis gilt für 500µl Gebrauchslösung aus Hybridisierungslösung 1 und 2 (XI.3.10).

215µl Formamid Gebrauchslösung (XI.3.12), 100µl (20x) SSC Gebrauchslösung (XI.3.14), 10µl Denhardt's Lösung (Eppendorf, Hamburg, 032 007.155) und 50µl Dextransulfat Gebrauchslösung (XI.3.15) in 55µl Aqua dest. vermischen. Auf Eis<sup>7</sup> stellen.

### **3.10. Gebrauchslösung aus Hybridisierungslösung 1 und 2**

Erst unmittelbar vor der Anwendung herstellen.

Hybridisierungslösung 1 (XI.3.8) und 2 (XI.3.9) mittels Vortexer<sup>8</sup> vermischen.

### **3.11. Heringsperma-DNA Gebrauchslösung**

5µl Heringsperma-DNA (Invitrogen, Carlsbad (Canada), Nr. 15634-017) mit 995µl TE-Puffer (1x) pH 8,0 (XI.3.16) vermischen.

### **3.12. Formamid Gebrauchslösung**

50ml Formamid (AppliChem, Darmstadt, Nr. 131956.1211) mit 5g AG 501-X8 Resin (Bio-Rad Laboratories, Hercules (Canada), 142-6424) versetzen und im Magnetrührer<sup>9</sup> vermischen, 30 Minuten. Anschließend 2-mal filtrieren<sup>10</sup>. Bei -20°C lagern.

### **3.13. *M. hyopneumoniae* Gebrauchslösung**

299µg Oligonucleotid Mycopl. Hyop (5'-CCGTCAAGACTAGAGCAT-3', Eurofins Genomics, Ebersberg) in 299µl DEPC-Wasser (XI.3.7) lösen.

### **3.14. (20x) SSC Gebrauchslösung**

175g NaCl (Carl Roth, Karlsruhe, Nr. 3957.1) und 88,2g Na-Citrat-Dihydrat (AppliChem, Darmstadt, Nr. A4522) in 1000ml DEPC-Wasser (XI.3.7) lösen und mit Salzsäure pH 7,0 einstellen.

### **3.15. Dextransulfat Gebrauchslösung 50%ig**

10g Dextransulfat (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Nr. D8906) mit 20g DEPC-Wasser (XI.3.7) vermischen. Im Kühlschrank lagern.

### **3.16. TE-Puffer (1x) pH 8,0**

1,58g Tris Hydrochlorid (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid, Carl Roth, Karlsruhe, Nr. 4855.2) mit 372mg EDTA (AppliChem, Darmstadt, Nr. A5097) in 1000ml Aqua dest. lösen und pH mit Salzsäure



auf 8,0 einstellen.

### **3.17. TE-Puffer (10x) pH 8,0**

15,76g Tris Hydrochlorid (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid, Carl Roth, Karlsruhe, Nr. 4855.2) mit 3,72g EDTA (AppliChem, Darmstadt, Nr. A5097) in 1000ml Aqua dest. lösen und pH mit Salzsäure auf 8,0 einstellen.

### **3.18. Eis-Ethanol Gemisch**

1kg Eis<sup>7</sup> 50ml Ethanol 96%ig übergießen.

### **3.19. (20x) SSC Verdünnungsstufen**

Durch Zugabe von DEPC-Wasser (XI.3.7) im entsprechenden Verhältnis von 1:10, 1:20 und 1:200 werden (2x, 1x und 0,1x) SSC Verdünnungsstufen aus (20x) SSC Gebrauchslösung (XI.3.14) hergestellt.

### **3.20. Äquilibrierungspuffer**

Für 1ml gebrauchsfertige Pufferlösung folgendes Mischverhältnis verwenden: 500µl (2x) Puffer I (XI.3.21), 500µl DEPC-Wasser (XI.3.7), 50µl Normalserum Ziege (MP Biomedicals, Eschwege, Nr. 29-391-49) und 30µl Triton-X (ApplyChem, Darmstadt, Nr. A4975) vermischen.

### **3.21. (2x) Puffer I**

200ml TrisHCl (1M) Pufferlösung (pH 7,5) (XI.3.5) zusammen mit 60ml NaCl (5M) (Carl Roth, Karlsruhe, Nr. 3957.1) in 1000ml DEPC-Wasser (XI.3.7) geben, autoklavieren<sup>5</sup>. Weitere Verdünnungsstufen sind durch Zugabe von DEPC-Wasser herzustellen.

### **3.22. Antikörper Gebrauchslösung**

1000µl Äquilibrierungspuffer (XI.3.20) mit 10µl Antikörper (Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments, Roche, Mannheim, Nr. 11093274910) versetzen.

### **3.23. Puffer III**

15,8g Tris Hydrochlorid (Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid, Carl Roth, Karlsruhe, Nr. 4855.2) und 5,8g NaCl (Carl Roth, Karlsruhe, Nr. 3957.1) in 800ml DEPC-Wasser (XI.3.7) auflösen und mit Salzsäure pH 9,5

einstellen. Anschließend 10,2g Magnesiumchlorid (AppliChem, Darmstadt, Nr. A4425) dazugeben und mit DEPC-Wasser auf 1000ml Volumen auffüllen, sterilfiltrieren

### **3.24. Gebrauchslösung Farbreaktion**

Zu 1000µl Puffer III (XI.3.23) 4,5µl NBT (4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid, Roche, Mannheim, Nr. 11383213001), 3,5µl BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat, Roche, Mannheim, Nr. 11383221001) und 2,5µl Levamisol Gebrauchslösung (XI.3.24) hinzugeben.

### **3.25. Levamisol Gebrauchslösung**

In 1ml Aqua dest. 96mg Levamisol (AppliChem, Darmstadt, Nr. A4341) lösen.

### **3.26. Verdünntes Häkalaun**

Mayer's Häkalaun (Merck, Darmstadt, Nr. 1.09249) im Verhältnis 1:1 mit Aqua dest. verdünnen.

### **3.27. 1%ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Gebrauchslösung**

Herzustellen aus 1 Anteil 30%iger H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Lösung (AppliChem, Darmstadt, Nr. 121076.1211) und 30 Anteilen Aqua dest.

### **3.28. 1%ige Target Retrieval Solution**

20ml (10x) Target Retrieval Solution (Agilent Dako, Santa Clara (USA), Nr. S236784-2) mit 180 ml Aqua dest. verdünnen.

### **3.29. (4x) SSC Verdünnungsstufe**

Herzustellen durch Verdünnen von (20x) SSC Gebrauchslösung (XI.3.14) mit DEPC-Wasser (XI.3.7) im Verhältnis 1:5.



## **XII. DANKSAGUNG**

An dieser Stelle ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Mathias Ritzmann für die Überlassung dieses Themas, die Betreuung, die Korrektur und die Möglichkeit diese Arbeit parallel zu meiner Anstellung verwirklichen zu können.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. med. vet. habil. Matthias Eddicks für die vielen Stunden inspirierender Erörterungen rund um diese Arbeit und um das allgemeine Leben sowie die Korrekturen.

Des Weiteren gilt mein Dank auch Dr. med. vet. Lina Eddicks für die Betreuung und Korrektur der pathologischen Komponente dieser Dissertation.

Außerdem danke ich der Leitung und den Mitarbeitern der Klinik für Schweine der Justus-Liebig-Universität Giessen für das Überlassen der verwendeten Proben und den dazugehörigen Daten sowie die Beantwortung jeglicher Fragen.

Besonderer Dank gilt auch den technischen Mitarbeitern des Instituts für Tierpathologie der Ludwig-Maximilians-Universität München für die Unterstützung bei der Durchführung des praktischen Teils der Arbeit. Den Einsatz von Frau Gudrun Goldmann möchte ich an dieser Stelle besonders hervorheben und ihr dafür danken.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Kolleginnen und Kollegen der Klinik für Schweine der Ludwig-Maximilians-Universität München für ihre bestmögliche Hilfe bei allen aufgetretenen Fragen bedanken.

Danke an Tanja und ihren Kolleginnen für die Hilfe bei der Digitalisierung der histologischen Schnitte.

Danke an Anne für die mentale Unterstützung, aufbauenden Spaziergänge und Korrektur der Arbeit.

Danke an meine Eltern die mich immer unterstützt haben und auch an meine Geschwister, besonders Alexander für die Korrektur.

